

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034379**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.01.31

(21) Номер заявки

201592302

(22) Дата подачи заявки

2014.05.30

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 9/10** (2006.01)**C07K 16/40** (2006.01)

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА ЛИПОПРОТЕИНОВ ПРОМЕЖУТОЧНОЙ ПЛОТНОСТИ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТА ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ ИНГИБИТОРА ПРОПРОТЕИНОВОЙ КОНВЕРТАЗЫ СУБТИЛИЗИН-КЕКСИНОВОГО ТИПА 9 (PCSK9)

(31) 61/828,753; 61/901,705; 61/919,836;
61/935,358; 61/953,959; 61/991,738;
14/290,544(32) 2013.05.30; 2013.11.08; 2013.12.23;
2014.02.04; 2014.03.17; 2014.05.12;
2014.05.29

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/US2014/040163

(87) WO 2014/194168 2014.12.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Сверголд Гари, Сасьела Уилльям Дж.,
Порди Роберт К. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012154999

WO-A1-2013039969

ANETTE VARBO ET AL.: "Remnant Cholesterol as a Causal Risk Factor for Ischemic Heart Disease", JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY, vol. 61, no. 4, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 427-436, XP055136401, ISSN: 0735-1097, DOI: 10.1016/j.jacc.2012.08.1026, page 427; figures 1-4

A.B. JORGENSEN ET AL.: "Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction", EUROPEAN HEART JOURNAL, vol. 34, no. 24, 17 December 2012 (2012-12-17), pages 1826-1833, XP055136634, ISSN: 0195-668X, DOI: 10.1093/eurheartj/ehs431, page 1827, left-hand column; figures 1-4

KAWASHIRI MASA-AKI ET AL.: "Statin Therapy Improves Fractional Catabolic Rate of LDL without Affecting Impaired VLDL and VLDL Remnant Catabolism in Homozygous FH Patient Due to PCSK9 Gene Mutation: Evidence from Kinetic Study with Stable Isotope", CIRCULATION, vol. 126, no. 21, Suppl. S, November 2012 (2012-11), page 13869, XP009179823, & AMERICAN-HEART-ASSOCIATION RESUSCITATION SCIENCE SYMPOSIUM; LOS ANGELES, CA, USA; NOVEMBER 03-04, 2012, the whole document

TOTH P.P. ET AL.: "Alirocumab, a Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Monoclonal Antibody, Reduces Cholesterol Concentrations of Serum Remnant Lipoprotein Fractions, Very Low-Density Lipoproteins and Triglycerides", CIRCULATION, vol. 128, no. 22, Suppl., 17 November 2013 (2013-11-17), page 17492, XP055136391, ISSN: 0009-7322, the whole document

(57) Изобретение относится к способу снижения концентрации холестерина липопротеинов промежуточной плотности (X-ЛПВП) в сыворотке крови у пациента, включающему отбор пациента с повышенным уровнем X-ЛПВП в сыворотке крови и введение ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексिनного типа 9 (PCSK9), где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, которые специфически связывают PCSK9.

B1**034379****034379 B1**

Область изобретения

Изобретение относится к области терапевтического лечения заболеваний и расстройств, сопровождающихся повышением уровней липопротеинов. Более конкретно, изобретение относится к введению ингибитора PCSK9 с целью снижения уровней остаточного холестерина и других субфракций липопротеинов в сыворотке крови у пациента.

Уровень техники

Остаточным холестерином (также называемым остаточным липопротеином) называется холестерин, в который входит холестерин не-ЛПВП и не-ЛПНП. Остаточные липопротеины являются продуктом липолиза ЛПОНП и включают ЛПОНП₃ и липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), которые являются прямым предшественником ЛПНП. Установлено, что уровень остаточного холестерина в сыворотке крови является прогностическим фактором риска ишемической болезни сердца. Помимо остаточного холестерина, имеется несколько субфракций холестерина липопротеинов низкой плотности (Х-ЛПНП), которые могут иметь значение для сердечно-сосудистой системы. В частности, Х-ЛПНП состоит из совокупности частиц ЛПНП различной плотности, находящихся на различной стадии липидизации. Снижение с помощью терапевтических способов уровня остаточного холестерина и уровней других субфракций липопротеинов в сыворотке крови может являться способом лечения сердечно-сосудистых расстройств или снижения риска их возникновения.

Фермент PCSK9 является пропротеиновой конвертазой, принадлежащей к подсемейству протеиназы К семейства секреторных субтилаз. Применение ингибиторов PCSK9 (антитела к PCSK9) для снижения уровня общего холестерина, холестерина ЛПНП и триглицеридов в сыворотке крови описано в патентах США № 8062640 и 8357371 и в опубликованной патентной заявке для США № 2013/0064834.

Краткое описание изобретения

Изобретение относится к способу снижения у пациента концентрации холестерина липопротеинов промежуточной плотности (Х-ЛППП) в сыворотке крови у пациента, включающему отбор пациента с повышенным уровнем Х-ЛППП в сыворотке крови и введение ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, которые специфически связывают PCSK9 и содержат определяющие комплементарность участки тяжелой и легкой цепи (CDR), имеющие SEQ ID NO: 76, 78, 80, 84, 86 и 88.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит от 20 до 200 мг ингибитора PCSK9, в частности фармацевтическая композиция содержит 75 или 150 мг ингибитора PCSK9.

В следующем варианте осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90 и область LCVR с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 92.

В другом варианте осуществления изобретения пациент получает лечение статинами на момент введения фармацевтической композиции или получал непосредственно до ее введения, где лечение статинами включает статин, выбранный из группы, состоящей из церивастатина, аторвастатина, симвастатина, питавастатина, розувастатина, флувастатина, ловастатина и правастатина, в частности, статином является аторвастатин.

В еще одном варианте осуществления изобретения пациент не получает лечение статинами на момент введения фармацевтической композиции.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидными после ознакомления с последующим подробным описанием.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана динамика взаимосвязи между mAb316P, свободным (несвязанным) PCSK9 и уровнями Х-ЛППП после однократного введения mAb316P в дозе 150 мг п/к у здоровых субъектов, не получавших фоновую терапию статином;

на фиг. 2 - средние концентрации свободного mAb316P у пациентов с геСГ и не-СГ, получавших mAb316P в дозе 50, 100 или 150 мг п/к в сочетании с аторвастатином или mAb316P в дозе 150 мг п/к в сочетании только с диетой. Пунктирная линия указывает предельное значение количественного определения свободного PCSK9 (0,0312 мг/дл);

на фиг. 3 - среднее изменение в процентах уровня Х-ЛППП от исходного значения в сравнении с общей концентрацией mAb316P (мг/дл) у пациентов (пациенты с геСГ и не-СГ в совокупности; n=21), получавших mAb316P в дозе 150 мг п/к в дни 1, 29 и 43. Точки указывают время взятия образцов крови: ч - час; д - день. Кривая гистерезиса смещается со временем по часовой стрелке, на что указывают стрелки, что свидетельствует о наличии временной связи между концентрацией mAb316P и изменением уровня Х-ЛППП;

на фиг. 4 - среднее изменение уровней свободного PCSK9 от исходного значения у пациентов с не-СГ, получавших аторвастатин или соблюдавших только диету (без терапии статином);

на фиг. 5 - кривые эффективности для Х-ЛППП для пациентов, получавших mAb316P в дозе 150 мг п/к или плацебо ± аторвастатин;

на фиг. 6 - среднее изменение в процентах уровней Х-ЛПНП от исходного значения со временем у пациентов с гиперхолестеринемией, получавших терапию статином, после введения mAb316P в дозе 50, 100 или 150 мг п/к 1 р./2 нед., в дозе 200 или 300 мг 1 р./4 нед. или плацебо. Символ (Δ) соответствует последним средним значениям, использованным вместо недостающих значений (LOCF);

на фиг. 7-9 - средние (СО) уровни холестерина ЛПОНП и субфракций остаточных липопротеинов и триглицеридов в сыворотке крови до и после введения плацебо и mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. в трех разных клинических исследованиях (А, В и С, результаты которых обобщены в табл. 1 этого документа). На фиг. 7 показаны результаты исследования А, на фиг. 8 показаны результаты исследования В и на фиг. 9 показаны результаты исследования С;

на фиг. 10-12 - средние (СО) значения содержания холестерина в субфракциях ЛПНП до и после введения плацебо и mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. в трех разных клинических исследованиях (А, В и С, результаты которых обобщены в табл. 1 этого документа). На фиг. 10 показаны результаты исследования А, на фиг. 11 показаны результаты исследования В и на фиг. 12 показаны результаты исследования С;

на фиг. 13 (часть А и Б) - изменения концентрации Апо СII и Апо СIII в зависимости от дозы исследуемого препарата соответственно для всех доз в исследовании А (результаты обобщены в табл. 1 этого документа).

Подробное описание

При интерпретации описания настоящего изобретения следует понимать, что его применение не ограничено описанными конкретными способами и экспериментальными условиями, поскольку эти способы и условия могут различаться. Следует также понимать и то, что терминология, используемая в этом документе, предназначена для описания только конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и не является ограничительной, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в этом документе, имеют то же значение, что и значение, которое обычно понимается средним специалистом в рассматриваемой области, к которой принадлежит настоящее изобретение. В контексте этого документа термин "приблизительно", в случае применения к конкретному указанному числовому значению, означает, что это значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в этом документе выражение "приблизительно 100" включает значения 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, схожие со способами и материалами, описанными в этом документе, или эквивалентные им, могут применяться при реализации на практике настоящего изобретения, ниже рассматриваются предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в этом документе, полностью включены в данный документ посредством ссылок.

Способы снижения уровня остаточного холестерина и других фракций липопротеинов.

Настоящее изобретение предлагает способы снижения уровня остаточного холестерина и других фракций липопротеинов в сыворотке крови у пациента. Способы настоящего изобретения включают отбор пациента с повышенным уровнем в сыворотке крови одного или более таких показателей как остаточный холестерин (также называется "холестерин остаточных липопротеинов", "остаточные липопротеины" или Х-ОЛП), холестерин липопротеинов очень низкой плотности (Х-ЛПОНП), холестерин липопротеинов промежуточной плотности (Х-ЛППП), триглицериды (ТГ) и (или) Лп(а). Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения способы включают отбор пациента с повышенным уровнем в сыворотке крови Х-ЛПОНП₁, Х-ЛПОНП₂, Х-ЛПОНП₁₊₂, Х-ЛПОНП₃, Х-ЛПНП₁, Х-ЛПНП₂, Х-ЛПНП₃, Х-ЛПНП₄, Х-ЛПНП₃₊₄ и (или) их комбинаций. Способы настоящего изобретения дополнительно предполагают введение пациенту фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9.

В контексте этого документа выражения "остаточный холестерин", "остаточные липопротеины" "ОЛП" и подобные им означают холестериновый компонент богатых триглицеридами липопротеинов, содержащих ЛПОНП и ЛППП натошак и один из этих двух липопротеинов вместе остаточными хиломикронами не натошак. Содержание остаточного холестерина можно рассчитать следующим образом: общий холестерин - Х-ЛПВП - Х-ЛПВП (не-[Х-ЛПВП + Х-ЛПНП]). К остаточному холестерину относятся ЛПОНП₃ и ЛППП.

К другим фракциям липопротеинов относятся, например, Х-ЛПНП₁ ("большой флотирующий" ЛПНП), Х-ЛПНП₂, Х-ЛПНП₃ и Х-ЛПНП₄ ("малый плотный" ЛПНП). Уровни этих липопротеинов в сыворотке крови можно определять с помощью стандартных методик определения субфракций липопротеинов, таких как вертикальное автопрофилирование (ВАП), подвижность ионов и др.

В контексте настоящего изобретения термин "повышенный уровень липопротеина в сыворотке крови" (например, повышенный уровень остаточного холестерина в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПОНП в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПОНП₁ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПВП₂ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПВП₁₊₂ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПОНП₃ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛППП в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПНП₁ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПНП₂ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПНП₃ в сыворотке крови, повышенный уровень Х-ЛПНП₄ в сыворотке крови, повышенный

уровень X-ЛПНП₃₊₄ в сыворотке крови и т.д.) означает уровень соответствующего липопротеина в сыворотке крови более приблизительно 8 мг/дл. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения считается, что у пациента повышен уровень липопротеина в сыворотке крови, если уровень конкретного липопротеина в сыворотке крови составляет у него более приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 мг/дл. Уровень липопротеина в сыворотке крови можно измерять у пациента после приема пищи. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, уровень липопротеина измеряют по прошествии некоторого периода времени после приема пищи (например, натощак через 6, 8, 10, 12 ч или более часов после приема пищи). Для измерения уровня липопротеина в сыворотке крови у пациента в контексте настоящего изобретения можно использовать любой клинически приемлемый диагностический метод.

Согласно настоящему изобретению снижение уровня остаточного холестерина или других липопротеиновых субфракций в сыворотке крови (например, X-ЛПОНП, X-ЛПОНП₁, X-ЛПОНП₂, X-ЛПОНП₁₊₂, X-ЛПОНП₃, X-ЛППП, X-ЛППП₁, X-ЛППП₂, X-ЛППП₁₊₂, X-ЛПНП_{1-С}, X-ЛПНП₂, X-ЛПНП_{2a}, X-ЛПНП_{2b}, X-ЛПНП_{1+2a}, X-ЛПНП₃, X-ЛПНП_{3a}, X-ЛПНП_{3b}, X-ЛПНП₄, X-ЛПНП_{4a}, X-ЛПНП_{4b}, X-ЛПНП_{4c}, X-ЛПНП_{4a+4b+4c+3b}, X-ЛПНП₃₊₄ и т.д.) означает, что уровень липопротеина/субфракции липопротеина в сыворотке крови у пациента после получения фармацевтической композиции по настоящему изобретению снизился приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80% или более от исходного уровня. В контексте этого документа "исходный уровень", применительно к конкретному липопротеину или субфракции липопротеина, означает уровень липопротеина/субфракции липопротеина, измеренный в сыворотке крови субъекта до получения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Снижение уровня липопротеина/субфракции липопротеина в сыворотке крови в результате введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть достигнуто и (или) наблюдаться через 1, 2, 3, 4, 5, 6 дней, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 недели или позже после начала схемы лечения, включающей введение одной или более доз фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, примеры которого рассматриваются в другом месте данного документа.

Например, настоящее изобретение включает способы снижения уровня остаточного холестерина в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем остаточного холестерина в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень остаточного холестерина в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 35% до приблизительно 45% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛПОНП в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем X-ЛПОНП в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, где уровень X-ЛПОНП в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 20% до приблизительно 28% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛПОНП₁₊₂ в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем X-ЛПОНП₁₊₂ в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень X-ЛПОНП₁₊₂ в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 20% до приблизительно 32% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛПОНП₃ в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем X-ЛПОНП₃ в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень X-ЛПОНП₃ в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 20% до приблизительно 27% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛППП в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем X-ЛППП в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень X-ЛППП в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 50% до приблизительно 56% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛПНП₁ в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем X-ЛПНП₁ в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень X-ЛПНП₁ в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 65% до приблизительно 78% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛПНП₂ в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем X-ЛПНП₂ в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень X-ЛПНП₂ в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 75% до приблизительно 85% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня X-ЛПНП₃₊₄ в сыворотке крови у

пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем Х-ЛПНП₃₊₄ в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень Х-ЛПНП₃₊₄ в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 45% до приблизительно 70% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Изобретение также включает способы снижения уровня аполипопротеина (Апо) СII и (или) СIII у пациента путем отбора пациента с гиперхолестеринемией и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, у пациента имеется несемейная гиперхолестеринемия (не-СГ); согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, у пациента имеется гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (геСГ) Согласно некоторым вариантам осуществления данного аспекта настоящего изобретения, уровень Апо СII снижается у пациента по меньшей мере на приблизительно от 9% до приблизительно 30% от исходного значения и уровень Апо СIII снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 20% до приблизительно 25% от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня Лп(а) в сыворотке крови у пациента путем отбора пациента с повышенным уровнем Лп(а) в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9, в которых уровень Лп(а) в сыворотке крови снижается у пациента по меньшей мере приблизительно на от 10% до приблизительно 40% (например, приблизительно на 25%, приблизительно на 30% или приблизительно на 35%) от исходного значения после введения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также включает способы снижения концентрации липопротеиновых частиц у пациента путем отбора пациента с гиперхолестеринемией и (или) повышенной концентрацией липопротеиновых частиц в сыворотке крови и введения ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9. Способы согласно этому аспекту настоящего изобретения полезны, помимо прочего, для снижения концентрации частиц липопротеина низкой плотности (Ч-ЛПНП), промежуточной плотности (Ч-ЛППП) и частиц липопротеина очень низкой плотности (Ч-ЛПОНП), включая способы снижения концентраций в сыворотке крови, например, малых Ч-ЛПОНП (диаметр от 29 до 42 нм); средних Ч-ЛПОНП (диаметр от 42 до 60 нм); больших Ч-ЛПОНП (диаметр > 60 нм); малых Ч-ЛПНП (диаметр от 18 до 20,5 нм); больших Ч-ЛПНП (диаметр от 20,5 до 23 нм); и Ч-ЛППП (диаметр от 23 до 29 нм).

Популяция пациентов.

Способы настоящего изобретения полезны для снижения у пациента уровня остаточного холестерина и других фракций липопротеинов в сыворотке крови (например, Х-ЛПОНП, Х-ЛПОНП₁, Х-ЛПОНП₂, Х-ЛПОНП₁₊₂, Х-ЛПОНП₃, Х-ЛППП, Х-ЛПНП₄, Х-ЛПНП₂, Х-ЛПНП₃, Х-ЛПНП₄, Х-ЛПНП₃₊₄ и др.). В некоторых случаях пациент не имеет другой патологии помимо повышенного уровня одного или более вышеупомянутых липопротеинов в сыворотке крови. Например, у пациента могут отсутствовать другие факторы риска сердечно-сосудистых, тромботических или других заболеваний или расстройств на момент лечения. В других случаях, однако, пациента отбирают на основании установленного диагноза или риска развития заболевания или нарушения, которое вызывается или коррелирует с повышенным уровнем остаточного холестерина в сыворотке крови или с повышенными уровнями других липопротеинов или фракций липопротеинов в сыворотке крови. Например, на момент или до введения фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, пациенту может быть установлен диагноз или он может иметь риск развития сердечно-сосудистого заболевания или расстройства, такого как, например, ишемическая болезнь сердца, острый инфаркт миокарда, бессимптомный атеросклероз сонных артерий, инсульт, окклюзионная болезнь периферических артерий и др. Сердечно-сосудистым заболеванием или расстройством в некоторых случаях является гиперхолестеринемия. Например, пациента могут отбирать для лечения по способам настоящего изобретения, если этому пациенту установлен диагноз или если у него имеется риск развития состояния с гиперхолестеринемией, такого как, например, гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (геСГ), гомозиготная семейная гиперхолестеринемия (гоСГ), аутомно-доминантная гиперхолестеринемия (АДГ, например АДГ, связанная с одной или более мутациями гена PCSK9), а также варианты гиперхолестеринемии, отличные от семейной гиперхолестеринемии (не-СГ).

В других случаях, на момент или до введения фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, пациенту может быть установлен диагноз или он может иметь риск развития заболеваний артерий, например, окклюзионной цереброваскулярной болезни, заболевания периферических сосудов, заболевания периферических артерий и др. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациента отбирают на основании установленного диагноза или риска развития комбинации двух или более из вышеперечисленных заболеваний или расстройств.

В других случаях пациента, которому предполагается назначение лечения по способам настоящего изобретения, можно отбирать на основании одного или более факторов, выбранных из группы, включающей такие факторы, как возраст (например, возраст старше 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 лет), раса, пол (мужской или женский), невыполнение физических упражнений (например, регулярное выполнение физических упражнений или невыполнение физических упражнений), другие ранее диагностированные заболевания (например, сахарный диабет 2 типа, повышенное артериальное давление) и применение

других лекарственных препаратов (например, применение статинов (например, церивастатина, аторвастатина, симвастатина, питевастатина, розувастатина, флувастатина, ловастатина, правастатина и др.), бета-блокаторов, ниацина и др.). Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня остаточного холестерина и (или) фракции липопротеина в сыворотке крови у пациентов с непереносимостью, отсутствием ответа или недостаточным ответом на традиционную терапию статинами. Потенциальных пациентов до проведения лечения по способам настоящего изобретения можно отбирать/выявлять с помощью скрининга на основании одного или более из этих факторов (например, с помощью опросника, диагностического обследования и др.).

Ингибиторы PCSK9.

Способы настоящего изобретения предполагают введение пациенту терапевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9. В контексте этого документа, "ингибитором PCSK9" является любое вещество, которое связывается или взаимодействует с PCSK9 человека и ингибирует его нормальную биологическую функцию *in vitro* или *in vivo*. Примерами групп ингибиторов PCSK9, помимо прочего, являются низкомолекулярные антагонисты PCSK9, пептидные антагонисты PCSK9 (например, "пептид-ассоциированные" молекулы) и антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связываются с человеческим PCSK9.

Термин "человеческая пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9" или "человеческий фермент PCSK9" или "hPCSK9", используемый в этом документе, относится к ферменту PCSK9, имеющему последовательность нуклеиновых кислот с SEQ ID NO:754 и аминокислотную последовательность с SEQ ID NO:755, или его биологически активному фрагменту.

Термин "антитело", используемый в этом документе, относится к молекулам иммуноглобулинов, содержащим четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области (в этом документе используется сокращение HCVR или V_H) и константной области. Константная область тяжелой цепи включает три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (в этом документе используется сокращение LCVR или V_L) и константной области. Константная область включает один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L в свою очередь включают гипервариабельные участки, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, называемыми каркасными (FR). Каждая область V_H и V_L состоит из трех участков CDR и четырех участков FR, которые располагаются от N-конца до карбоксильного конца белковой цепи в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения, участки FR антитела к PCSK9 (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут иметь последовательность, идентичную герминативным последовательностям человека или могут иметь естественные или искусственные модификации. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определить путем непосредственного сопоставления двух или более участков CDR.

Термин "антитело", используемый в документе, также включает антигенсвязывающие фрагменты или полные молекулы антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и им подобные, используемые в этом документе, включают любые естественные, получаемые ферментативным путем, синтетические или получаемые методом генной инженерии полипептиды или гликопротеины, которые специфически связываются с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антител путем использования любых подходящих стандартных методик, например протеолитического расщепления или генной инженерии с применением рекомбинантных технологий с изменением и экспрессией ДНК, кодирующей вариабельные и, в некоторых случаях, константные домены антитела. Такая ДНК известна и (или) легко доступна из, например, коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), либо ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать или изменять химически либо с помощью методик молекулярной биологии, например, для придания одному или более вариабельным и (или) константным доменам подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Примерами антигенсвязывающих фрагментов, помимо прочего, являются: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты $F(ab')_2$; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) единицы минимального распознавания аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельные участки антитела (например, отдельный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3), или пептиды с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие генно-инженерные молекулы, например домен-специфические антитела, антитела с одним доменом, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и др.), иммунофармацевтические вещества на основе модульного низкомолекулярного белка (SMIP) и вариабельные акульи домены IgNAR, также входят в понятие "антигенсвязывающий фрагмент" в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно включает по меньшей мере один вариабельный

домен. Варибельный домен может иметь любой размер или аминокислотную последовательность и обычно включает по меньшей мере один участок CDR, который прилежит к каркасному участку или находится в каркасном участке с одной или более последовательностями каркасного участка. В антигенсвязывающих фрагментах с доменом V_H , связанным с доменом V_L домены V_H и V_L могут располагаться относительно друг друга любым подходящим образом. Например, варибельная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один варибельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Примерами конфигураций варибельных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела в рамках настоящего изобретения, помимо прочего, являются: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; и (xiv) V_L - C_L . При любой конфигурации варибельных и константных доменов, включая любую из представленных выше конфигураций, варибельные и константные домены могут либо быть напрямую связаны друг с другом, либо связаны посредством полной или частичной шарнирной области либо посредством линкерной области. Шарнирная область может включать по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислоты, что приводит к возникновению гибкой или полугибкой связи между прилежащими варибельными и (или) константными доменами в молекуле, представляющей собой одиночный полипептид. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела в рамках настоящего изобретения может включать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) с любой из перечисленных выше конфигураций варибельных и константных доменов, связанных друг с другом нековалентной связью, и (или) с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, дисульфидной(-ыми) связью(-ями)).

Как и в случае с полными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно состоит по меньшей мере из двух разных варибельных доменов, в котором каждый варибельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или другим эпитопом этого же антигена. Любое мультиспецифическое антитело, включая биспецифические антитела, рассматриваемые в этом документе, можно использовать в контексте настоящего изобретения как антигенсвязывающий фрагмент антитела с применением стандартных методик, доступных в рассматриваемой области.

Константная область антитела играет важную роль в способности антитела фиксировать комплемент и вызывать клеточно-опосредованную цитотоксичность. Таким образом, изотоп антитела можно выбирать с учетом желательности наличия для него способности опосредовать цитотоксичность.

Термин "человеческое антитело", используемый в этом документе, включает антитела с варибельными и константными областями, полученными из герминативных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие антитела, являющиеся предметом настоящего изобретения, могут, тем не менее, включать аминокислотные остатки, не кодируемые герминативными последовательностями иммуноглобулина человека (например, мутации, возникшие вследствие случайного сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или соматические мутации, возникшие *in vivo*), например в участках CDR и, в частности, в участке CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в этом документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из герминативных последовательностей других видов млекопитающих, например мышей, были внесены в каркасную последовательность у человека.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело", используемый в этом документе, включает все человеческие антитела, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных методик, например антитела, экспрессированные с применением вектора рекомбинантной экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано ниже), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека (описано ниже), антитела, изолированные от животного (например, мышей), являющегося трансгенным для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor с соавт. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) или антитела, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который предполагает сплайсинг гена иммуноглобулина человека до других последовательностей ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют варибельные и константные области, полученные из герминативной последовательности иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвержены мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное с трансгенностью в отношении последовательностей человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из родственных для человека герминативных последовательностей V_H и V_L , могут отсутствовать в нормальных условиях в герминативном наборе антител человека *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, зависящих от гетерогенности шарнирной области. В одной форме, молекула иммуноглобулина стабильную четырехцепочечную конструкцию с молекулярной массой около 150-160 кДа, и ее тяжелые цепи скреплены друг с другом межцепочечной дисульфидной связью. Во второй форме димеры не соединены межцепочечными дисульфидными связями и формируют молекулу массой приблизительно 75-80 кДа, состоящую из легкой и тяжелой цепей, соединенных ковалентной связью (полуантитело). Эти формы крайне тяжело отделить друг от друга, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы среди различных интактных изоформ IgG обусловлена, помимо прочего, структурными различиями, связанными с шарнирной областью изоформ антитела. Замена одной аминокислоты в шарнирной области человеческого IgG4 может существенно снизить частоту появления второй формы (Angal с соавт. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнирной области человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела с одной или более мутациями в шарнирной области, область CH2 или CH3, что может быть желательным, например, при производстве, для увеличения выхода желаемой формы антитела.

Термин "выделенное антитело", используемый в этом документе, означает антитело, которое было идентифицировано и выделено и (или) получено по меньшей мере из одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, которое было отделено от или получено из по меньшей мере одного компонента организма или из ткани либо клетки, в которой антитело существует или образуется в естественных условиях, является "выделенным антителом" для целей настоящего изобретения. Выделенным антителом также является антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенными антителами являются антитела, которые прошли по меньшей мере одну стадию очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения выделенное антитело может быть практически свободно от другого клеточного материала и (или) химических веществ.

Термин "специфически связывается" и подобные ему означают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Способы определения связывается ли антитело с антигеном специфически хорошо известны в рассматриваемой области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, и тому подобные способы. Например, антитело, которое "специфически связывается" с PCSK9, в контексте настоящего изобретения включает антитела, которые связываются с PCSK9 или его частью с K_D менее приблизительно 1000 нМ, менее приблизительно 500 нМ, менее приблизительно 300 нМ, менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 80 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 40 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 20 нМ, менее приблизительно 10 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ или менее приблизительно 0,5 нМ, при определении с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса. Выделенное антитело, которое специфически связывается с PCSK9, может, однако, иметь перекрестную реактивность к другим антигенам, например к молекулам PCSK9 других видов (не человека).

Антитела к PCSK9, используемые для способов настоящего изобретения, могут включать одну или более аминокислотных замен, вставок и (или) делеций в каркасном участке и (или) участках CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей в сравнении с соответствующими герминативными последовательностями, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, указанных в этом документе, с герминативными последовательностями, представленными, например, в общедоступных базах последовательностей для антител. Настоящее изобретение включает способы, предполагающие применение антител и их антигенсвязывающих фрагментов, получаемых с использованием любых аминокислотных последовательностей, рассматриваемых в этом документе, в которых одна или более аминокислот в пределах одного или более каркасных участков и (или) участков CDR подвергаются мутации до соответствующего(их) остатка(ов) герминативной последовательности, из которой было получено антитело, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой герминативной последовательности человека, или до консервативной замены аминокислоты соответствующего(их) герминативного(ых) остатка(ов) (такие изменения последовательности называются в этом документе в целом "герминативные мутации"). Средний специалист в рассматриваемой области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, рассматриваемых в этом документе, может легко получить разнообразные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, включающие одну или более отдельных герминативных мутаций или их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, все каркасные остатки и (или) остатки участков CDR в пределах домена V_H и (или) домена V_L подвергаются обратной мутации до остатков, обнаруживаемых в исходной герминативной последовательности, из которой были получены антитела. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, только некоторые остатки подвергаются обратным мутациям до исходной герминативной последовательности, например только мутантные остатки обнаруживаемые в первых 8 аминокислотах фрагмента FR1 или в последних 8 аминокислотах фрагмента FR4, или только мутантные остатки, обнаруживаемые в участках CDR1, CDR2

или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения один или более остатков каркасных участков и (или) участков CDR подвергаются мутации до соответствующих остатков различных герминативных последовательностей (т.е. герминативной последовательности, которая отличается от герминативной последовательности, из которой было изначально получено антитело). Кроме того, антитела настоящего изобретения могут содержать любую комбинацию двух или более герминативных мутаций в каркасных участках и (или) участках CDR, например, когда некоторые отдельные остатки подвергаются мутации до соответствующего остатка конкретной герминативной последовательности, а некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной герминативной последовательности, сохраняются или подвергаются мутации до соответствующих остатков другой герминативной последовательности. Полученные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или более герминативных мутаций, можно легко проверить на наличие одного или более желаемых свойств, например улучшенной специфичности связывания, улучшенных или усиленных антагонистических или агонистических биологических свойств (тех, которые требуются), сниженной иммуногенности и т.д. Применение антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных таким общим образом, охватывается настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает способы, предполагающие использование антител к PCSK9, содержащих варианты любых аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и (или) CDR, указанных в этом документе, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает использование антител к PCSK9, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и (или) CDR с, например 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любых аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и (или) CDR, указанных в этом документе.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс", используемый в этом документе, относится к оптическому феномену, который позволяет анализировать взаимодействия в реальном времени путем выявления изменений концентрации белка в биосенсорном матриксе, например с помощью системы BIAcore™ (подразделение Biacore Life Sciences компании GE Healthcare, Piscataway, NJ, США).

Термин "K_d", используемый в этом документе, означает равновесную константу диссоциации для конкретного взаимодействия антитела и антигена.

Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком молекулы антитела, называемым паратом. У одного антигена может быть несколько эпитопов. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут обладать различными биологическими эффектами. Эпитопы могут быть конформационными и линейными.

Конформационный эпитоп образуется за счет пространственного смежного расположения аминокислоты из различных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образуется за счет прилегающих аминокислотных остатков полипептидной цепи. В некоторых случаях эпитопы антигена могут включать части сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело к PCSK9, используемое для способов настоящего изобретения, является антителом с рН-зависимыми характеристиками связывания. В контексте этого документа выражение "рН-зависимые характеристики связывания" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются "пониженным связыванием с PCSK9 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" (для целей настоящего документа оба выражения могут использоваться взаимозаменяемо). Например, к антителам с "рН-зависимыми характеристиками связывания" относятся антитела и их антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с PCSK9 с более высокой аффинностью при нейтральном рН по сравнению с кислым рН. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с PCSK9 при нейтральном рН с аффинностью, которая превышает аффинность при кислом рН по меньшей мере в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более раз.

Согласно этому аспекту настоящего изобретения антитела к PCSK9 с рН-зависимыми характеристиками связывания могут обладать одной или более аминокислотными вариациями относительно исходного антитела к PCSK9. Например, антитело к PCSK9 с рН-зависимыми характеристиками связывания может содержать одну или более гистидиновых замен или вставок, например один или более участков CDR исходного антитела к PCSK9. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения представлены способы, включающие введение антитела к PCSK9, содержащего аминокислотные последовательности CDR (например, тяжелые и легкие цепи CDR), которые идентичны аминокислотным последовательностям CDR исходного антитела к PCSK9, за исключением замены одной или более аминокислот одного или более участков CDR исходного антитела гистидиновым остатком. Антитела к PCSK9 с рН-зависимыми характеристиками связывания могут иметь, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более гистидиновых замен либо в одном участке CDR исходного антитела, либо в нескольких участках (например, в 2, 3, 4, 5 или 6) CDR исходного антитела к PCSK9. Например, настоящее изобретение включает использование антител к PCSK9 с рН-зависимыми характеристиками связывания,

имеющими одну или более гистидиновых замен в участке HCDR1, одну или более гистидиновых замен в участке HCDR2, одну или более гистидиновых замен в участке HCDR3, одну или более гистидиновых замен в участке LCDR1, одну или более гистидиновых замен в участке LCDR2 и (или) одну или более гистидиновых замен в участке LCDR3 исходного антитела к PCSK9.

В контексте этого документа выражение "кислый pH" означает pH 6,0 или менее (например, менее приблизительно 6,0, менее приблизительно 5,5, менее приблизительно 5,0 и т.д.). Выражение "кислый pH" охватывает значения pH приблизительно 6,0, 5,95, 5,90, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. В контексте этого документа выражение "нейтральный pH" означает значение pH приблизительно от 7,0 до 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Получение человеческих антител.

Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей хорошо известны в рассматриваемой области. Все эти известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с человеческим PCSK9.

При использовании технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патент США № 6596541, Regenon Pharmaceuticals) или любого другого известного метода для получения моноклональных антител, изначально получают химерные антитела с высокой аффинностью к ферменту PCSK9, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® предполагает получение трансгенной мыши с геномом, включающим ген, кодирующий вариабельные области человеческих тяжелой и легкой цепей, оперативно связанный с геном, кодирующим эндогенную мышиную константную область, так что у мыши в ответ на антигенную стимуляцию образуются антитела, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Участки ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с участками ДНК, кодирующими константные области тяжелой и легкой цепей человека. ДНК затем экспрессируется в клетке, способной продуцировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь с геномом, модифицированным по технологии VELOCIMMUNE®, подвергают воздействию изучаемого антигена, и у нее забирают лимфоциты (например, В-лимфоциты), продуцирующие антитела. Полученные лимфоциты можно объединить с миеломными клетками для создания бессмертных гибридных клеточных линий, и такие гибридные клеточные линии подвергаются скринингу и отбору для выявления линий, вырабатывающих антитела, специфичные к изучаемому антигену. ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей можно выделить и связать с желаемыми изотипическими константными областями тяжелой и легкой цепей. Такой белок антитела может вырабатываться клеткой, например клеткой яичника китайского хомячка. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующая антиген-специфические химерные антитела или вариабельные домены легкой и тяжелой цепей можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Сначала выделяют химерные антитела с высокой аффинностью с человеческой вариабельной областью и мышиную константную область. Определяют свойства этих антител и отбирают антитела с желаемыми свойствами, включая аффинность, селективность, характеристиками эпитопа и т.д. с использованием стандартных методик, известных специалистам в рассматриваемой области. Мышинные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью для получения полностью человеческого антитела, являющегося предметом настоящего изобретения, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного. Несмотря на то что выбранная константная область может отличаться в соответствии со специфичностью применения антитела, антигенсвязывающая способность с высокой аффинностью и мишень-специфические характеристики сохраняются в вариабельной области.

В целом, антитела, которые можно использовать для способов настоящего изобретения, обладают высокой аффинностью, как указано выше, при оценке их способности связываться с антигеном после иммобилизации на твердой фазе или в жидкой фазе. Мышинные константные области заменяют желаемыми человеческими константными областями для получения полностью человеческого антитела настоящего изобретения. Несмотря на то что выбранная константная область может различаться в соответствии со специфичностью применения антитела, антигенсвязывающая способность с высокой аффинностью и мишень-специфические характеристики сохраняются в вариабельной области.

Конкретными примерами человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с PCSK9 и которые можно применять в контексте способов настоящего изобретения, являются любые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, включающие три участка CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), входящие в вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2, 18, 22, 26, 42, 46, 50, 66, 70, 74, 90, 94, 98, 114, 118, 122, 138, 142, 146, 162, 166, 170, 186, 190, 194, 210, 214, 218, 234, 238, 242, 258, 262, 266, 282, 286, 290, 306, 310, 314, 330, 334, 338, 354, 358, 362, 378, 382, 386, 402, 406, 410, 426, 430, 434, 450, 454, 458, 474, 478, 482, 498, 502, 506, 522, 526, 530, 546, 550, 554, 570, 574, 578, 594, 598, 602, 618, 622, 626, 642, 646, 650, 666, 670, 674, 690, 694, 698, 714, 718, 722, 738 и 742; или в значительной степени схожих последовательностей, совпадающих по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может включать три участка CDR легкой цепи (LCVR1, LCVR2, LCVR3), входящие в вариабельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 10, 20, 24, 34, 44, 48, 58, 68, 72, 82, 92, 96, 106, 116, 120, 130, 140, 144, 154, 164, 168, 178, 188, 192, 202, 212, 216, 226, 236, 240, 250, 260, 264, 274, 284, 288, 298, 308, 312, 322, 332, 336, 346, 356, 360, 370, 380, 384, 394, 404, 408, 418, 428, 432, 442, 452, 456, 466, 476, 480, 490, 500, 504, 514, 524, 528, 538, 548, 552, 562, 572, 576, 586, 596, 600, 610, 620, 624, 634, 644, 648, 658, 668, 672, 682, 692, 696, 706, 716, 720, 730, 740 и 744; или в значительной степени схожие последовательности, совпадающие по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает шесть участков CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из пар аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранных из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2/10, 18/20, 22/24, 26/34, 42/44, 46/48, 50/58, 66/68, 70/72, 74/82, 90/92, 94/96, 98/106, 114/116, 118/120, 122/130, 138/140, 142/144, 146/154, 162/164, 166/168, 170/178, 186/188, 190/192, 194/202, 210/212, 214/216, 218/226, 234/236, 238/240, 242/250, 258/260, 262/264, 266/274, 282/284, 286/288, 290/298, 306/308, 310/312, 314/322, 330/332, 334/336, 338/346, 354/356, 358/360, 362/370, 378/380, 382/384, 386/394, 402/404, 406/408, 410/418, 426/428, 430/432, 434/442, 450/452, 454/456, 458/466, 474/476, 478/480, 482/490, 498/500, 502/504, 506/514, 522/524, 526/528, 530/538, 546/548, 550/552, 554/562, 570/572, 574/576, 578/586, 594/596, 598/600, 602/610, 618/620, 622/624, 626/634, 642/644, 646/648, 650/658, 666/668, 670/672, 674/682, 690/692, 694/696, 698/706, 714/716, 718/720, 722/730, 738/740 и 742/744.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело к PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать для способов настоящего изобретения, имеют аминокислотные последовательности HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3, выбранные из аминокислот SEQ ID NO: 76/78/80/84/86/88 (mAb316P) и 220/222/224/228/230/232 (mAb300N) (см. опубликованную патентную заявку для США № 2010/0166768).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранные из группы, состоящий из последовательностей SEQ ID NO: 2/10, 18/20, 22/24, 26/34, 42/44, 46/48, 50/58, 66/68, 70/72, 74/82, 90/92, 94/96, 98/106, 114/116, 118/120, 122/130, 138/140, 142/144, 146/154, 162/164, 166/168, 170/178, 186/188, 190/192, 194/202, 210/212, 214/216, 218/226, 234/236, 238/240, 242/250, 258/260, 262/264, 266/274, 282/284, 286/288, 290/298, 306/308, 310/312, 314/322, 330/332, 334/336, 338/346, 354/356, 358/360, 362/370, 378/380, 382/384, 386/394, 402/404, 406/408, 410/418, 426/428, 430/432, 434/442, 450/452, 454/456, 458/466, 474/476, 478/480, 482/490, 498/500, 502/504, 506/514, 522/524, 526/528, 530/538, 546/548, 550/552, 554/562, 570/572, 574/576, 578/586, 594/596, 598/600, 602/610, 618/620, 622/624, 626/634, 642/644, 646/648, 650/658, 666/668, 670/672, 674/682, 690/692, 694/696, 698/706, 714/716, 718/720, 722/730, 738/740 и 742/744.

Фармацевтические композиции и способы применения.

Настоящее изобретение включает способы, заключающиеся в введении пациенту ингибитора PCSK9, в которых ингибитор PCSK9 входит в состав фармацевтической композиции. В состав фармацевтических композиций настоящего изобретения входят подходящие носители, вспомогательные вещества и другие вещества, обеспечивающие надлежащие перенос, доставку и переносимость композиции, а также прочие ее свойства. Множество подходящих лекарственных форм можно найти в справочниках, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, США. К этим лекарственным формам относятся, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидосодержащие везикулы (катионные или анионные) (например, LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсия масла в воде и воды в масле, эмульсия карбовакса (твердый полиэтиленгликоль различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell с соавт. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Известны различные системы доставки, которые могут использоваться для введения фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, например препараты, инкапсулированные в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu с соавт., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, помимо прочего, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и пероральное введение, а также другие способы. Настоящая композиция может быть доставлена в организм любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, либо за счет всасывания через эпителиальные и слизисто-кожные выстилки (например, слизистая оболочка полости рта, прямой кишки и кишечника); также ее можно вводить с другими биологически активными средствами.

Фармацевтическую композицию, являющуюся предметом настоящего изобретения, можно вводить

подкожно или внутривенно с помощью стандартных иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожного введения, то фармацевтическую композицию, являющуюся предметом настоящего изобретения, можно вводить с помощью шприц-ручки. Такая шприц-ручка может быть предназначена для многократного или однократного пользования. Шприц-ручка многократного пользования обычно имеет заменяемый картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После введения фармацевтической композиции, содержащейся в картридже, пустой картридж можно выбросить и заменить на новый, содержащий фармацевтическую композицию. Шприц-ручку затем можно использовать заново. Шприц-ручка однократного пользования не имеет заменяемого картриджа. Шприц-ручка однократного пользования имеет емкость, заполненную фармацевтической композицией. Такую шприц-ручку после введения фармацевтической композиции выбрасывают.

Для подкожного введения фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, можно использовать различные шприц-ручки и им подобные устройства многократного пользования. Примерами, помимо прочего, являются шприц-ручка AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., г. Вудсток, Великобритания), шприц-ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, г. Бергдорф, Швейцария), шприц-ручка HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручка HUMALOG™, шприц-ручка HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., г. Индианаполис, штат Индианаполис, США), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, г. Копенгаген, Дания), шприц-ручка BD™ (Becton Dickinson, г. Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси, США), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, г. Франкфурт, Германия). Примерами шприцов-ручек однократного пользования, которые могут быть использованы для подкожного введения фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, являются, помимо прочего, шприцы-ручки SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ (Amgen, г. Саузенд Оукс, штат Калифорния, США), PENLET™ (Haselmeier, г. Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park IL).

В некоторых случаях фармацевтическую композицию можно вводить с помощью системы с контролируемым высвобождением лекарственного вещества. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения можно использовать помпу (см. Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения можно использовать полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida, США. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения систему с контролируемой доставкой лекарственного вещества можно размещать вблизи целевого органа, что требует введения лишь части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемой доставкой лекарственного вещества рассматриваются в обзорной статье Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

К инъекционным препаратам могут относиться лекарственные формы для внутривенного, подкожного, внутрикожного и внутримышечного инъекционного введения, формы для внутривенного капельного введения и др. Эти инъекционные препараты можно готовить с помощью известных способов. Например, инъекционные препараты можно готовить путем растворения, суспендирования или эмульсифицирования антитела или его соли, описанной выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для приготовления инъекционных препаратов. В качестве водных сред для приготовления инъекционных препаратов используются изотонический раствор хлорида натрия, изотонический раствор глюкозы и других вспомогательных веществ, например веществ, которые могут быть использованы в комбинации с подходящими солюбилизующими веществами, например спиртом (например, этиловым спиртом), полиспиртом (например, пропиленгликолем, полиэтиленгликолем), неионными сурфактантами (например, полисорбатом 80, аддуктом гидрогенизированного касторового масла НСО-50 (полиоксиэтилен (50 моль)) и др. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и др., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим веществом, например бензилбензоатом, бензиловым спиртом и др. Приготовленный таким образом инъекционный препарат можно помещать в подходящую ампулу.

Фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, рассмотренные выше, готовят в виде лекарственных форм с унифицированной дозой, соответствующей дозе действующих веществ. К таким лекарственным формам с унифицированной дозой относятся, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекционные лекарственные формы (раствор в ампулах), свечи и др.

Дозировка.

Количество ингибитора PCSK9 (например, антитела к PCSK9), вводимое субъекту согласно способам настоящего изобретения, обычно является терапевтически эффективным количеством. В контексте этого документа фраза "терапевтически эффективное количество" означает дозу ингибитора PCSK9, которая приводит к обнаруживаемому снижению (по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75% или более от исходного значения) одного или более показателей, выбранных из группы, состоящей из остаточного холестерина (Х-ОЛП), Х-ЛПОНП, Х-ЛПОНП₁, Х-ЛПОНП₂, Х-ЛПОНП₁₊₂, Х-ЛПОНП₃, Х-ЛППП, Х-ЛПНП₁, Х-ЛПНП₂, Х-ЛПНП₃, Х-ЛПНП₄, Х-ЛПНП₃₊₄.

В качестве альтернативы, для решения вопроса о том, является ли конкретное количество испытуемого ингибитора PCSK9 терапевтически эффективным количеством, можно использовать животные модели.

В случае антитела к PCSK9, терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 600 мг, например приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1,0 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 210 мг, приблизительно 220 мг, приблизительно 230 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 260 мг, приблизительно 270 мг, приблизительно 280 мг, приблизительно 290 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 460 мг, приблизительно 470 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 490 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 510 мг, приблизительно 520 мг, приблизительно 530 мг, приблизительно 540 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 560 мг, приблизительно 570 мг, приблизительно 580 мг, приблизительно 590 мг или приблизительно 600 мг антитела к PCSK9.

Количество антитела к PCSK9, содержащееся в отдельных дозах, можно выражать в миллиграммах антитела на килограмм массы тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антитело к PCSK9 можно вводить пациенту в дозе приблизительно от 0,0001 до приблизительно 10 мг/кг массы тела.

Комбинированная терапия.

Способы настоящего изобретения согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения могут включать введение фармацевтической композиции, содержащей антитело к PCSK9, пациенту, который получает препарат для лечения гиперхолестеринемии на момент введения фармацевтической композиции, являющейся предметом настоящего изобретения, или получал его непосредственно перед ее введением. Например, пациенту, у которого ранее была диагностирована гиперхолестеринемия, мог быть назначен другой препарат, и он может получать его в стабильной дозе на момент введения фармацевтической композиции, содержащей антитело к PCSK9, и (или) мог получать его до ее введения. К таким препаратам могут относиться, например, (1) средство, снижающее синтез холестерина в клетке путем ингибирования 3-гидрокси-3-метилглутарил (ГМГ)-кофермент А (КоА) редуктазы, например статины (например, церивастатин, аторвастатин, симвастатин, питавастатин, розувастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин и др.); (2) средство, ингибирующее захват холестерина и (или) обратное всасывание желчных кислот; (3) средство, усиливающее катаболизм липопротеинов (например, ниацин); и (или) (4) активаторы фактора транскрипции LXR, играющего роль в элиминации холестерина, например 22-гидроксистерин. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациент до или на момент введения антитела к PCSK9 получает терапевтическое средство, представляющее собой комбинацию лекарственных средств в фиксированной дозе, например эзетимиб в комбинации с симвастатином; статины в комбинации с секвестрантом желчных кислот (например, холестирамином, колестиполом, колесевеламом); ниацин в комбинации со статином (например, ниацин с ловастатином); или другие липидснижающие средства, например эфиры омега-3-жирных кислот (например, Омакор).

Схемы введения.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения субъекту можно многократно вводить ингибитор PCSK9 (например, фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор PCSK9) в течение некоторого периода времени. Согласно этому аспекту настоящего изобретения способы включают последовательное введение субъекту доз ингибитора PCSK9. В контексте этого документа "последовательное введение" означает, что каждую дозу ингибитора PCSK9 вводят субъекту в разные моменты времени, например в разные дни через заранее некоторые интервалы (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, заключающиеся в ведении пациенту одной первичной дозы ингибитора PCSK9 с последующим введением одной или более вторичных доз ингибитора PCSK9 и, в некоторых случаях, с последующим введением одной или более третичных доз ингибитора PCSK9.

Термины "первичные дозы", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся ко временной последовательности введения отдельных доз фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9. Таким образом, "первичная доза" это доза, которую вводят в начале лечения (также называется "исходная доза"); "вторичные дозы" это дозы, которые вводят после введения первичной дозы; и "третичные дозы" это дозы, которые вводят после введения вторичных доз. Первичные, вторичные и третичные дозы могут все содержать одинаковое количество ингибитора PCSK9, однако обычно они отличаются друг от друга в плане частоты введения. Однако согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, количество ингибитора PCSK9 в первичных, вторичных и (или) вторичных дозах может разли-

чаться (например, увеличиваться или уменьшаться согласно необходимости) в ходе лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, вводят одну или более доз (например, 2, 3, 4 или 5) в начале лечения в качестве "нагрузочных доз" с последующим более редким введением доз (например, "поддерживающих доз").

Согласно одному примеру осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и (или) третичную дозу вводят через 1-26 (например, через 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после введения непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", используемая в этом документе, означает, что в течение интервала времени с последовательным введением нескольких доз пациенту вводят дозу антиген-связывающей молекулы перед введением следующей дозы без введения в этом интервале времени других доз.

Согласно этому аспекту настоящего изобретения способы могут включать введение пациенту любого количества вторичных и (или) третичных доз ингибитора PCSK9. Например, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения, пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения с введением нескольких вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2, 4, 6 или 8 недель непосредственно после введения предшествующей дозы. Аналогично, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения с введением нескольких третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 1-2, 4, 6 или 8 недель после введения непосредственно предшествующей дозы. В качестве альтернативы, частота введения вторичных и (или) третичных доз пациенту может различаться в течение периода лечения. Частота введения также может корректироваться в течение периода лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Настоящее изобретение включает назначение схем лечения, предполагающих повышение дозы (также называемом в этом документе "модификация дозы"). В контексте этого документа термин "повышение дозы" означает, что если у пациента после получения определенного количества доз ингибитора PCSK9 не наблюдается установленного снижения уровня одного или более заданных терапевтических показателей, дозу ингибитора PCSK9 в последующем повышают. Например, в случае применения лечебной схемы, предполагающей введение пациенту антитела к PCSK9 в дозе 75 мг с частотой один раз в две недели, если у пациента через 8 недель (т. е. после введения 5 доз на неделе 0, 2 и 4, 6 и 8) не снижается концентрация X-ЛПНП в сыворотке крови до значения менее 70 мг/дл, то в последующем дозу антитела к PCSK9 повышают до, например, 150 мг с введением один раз в две недели (например, начиная с недели 10 или недели 12 или позже).

Примеры

Следующие примеры приведены с целью предоставления средним специалистам в рассматриваемой области полного раскрытия информации и полного описания того, как надлежит выполнять и применять способы и композиции, являющиеся предметом настоящего изобретения, и не имеют своей целью ограничить ту область, которую изобретатели считают своим изобретением. Был приложен все усилия для обеспечения точности приведенных числовых значений (например, количества, температура и т.д.), однако следует учитывать вероятность некоторых экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, части - это части по массе, молекулярная масса - это средняя молекулярная масса, температура - это температура в градусах Цельсия и давление - это давление на уровне атмосферного давления или близкое к нему.

Пример 1. Получение человеческих антител к человеческому ферменту PCSK9.

Человеческие антитела к PCSK9 получали согласно патенту США № 8062640. Примером ингибитора PCSK9, используемого в следующем примере, является человеческое антитело к PCSK9 обозначаемое "mAb316P" (также именуемое в научной литературе алироцумаб). Антитело mAb316P имеет следующие характеристики аминокислотной последовательности: переменная область тяжелой цепи (HCVR), имеющая последовательность SEQ ID NO: 90; переменная область легкой цепи (LCVR), имеющая последовательность SEQ ID NO: 92; определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (HCDR1), имеющий последовательность SEQ ID NO: 76; HCDR2, имеющий последовательность SEQ ID NO: 78; HCDR3, имеющий последовательность SEQ ID NO: 80; определяющий комплементарность участок легкой цепи 1 (LCDR1), имеющий последовательность SEQ ID NO: 84; LCDR2, имеющий последовательность SEQ ID NO: 86; and LCDR3, имеющий последовательность SEQ ID NO: 88.

Пример 2. Корреляция между уровнями антител к PCSK9 и уровнями холестерина липопротеинов

низкой плотности (Х-ЛПНП).

Введение.

Описательные анализы данных о фармакокинетике и фармакодинамике из исследований фазы I и II mAb316P были выполнены с целью характеристики зависимости между уровнями mAb316P, PCSK9 и Х-ЛПНП. В анализ были включены три разных клинических исследования.

(1) Исследование с введением одной дозы.

Исследование с введением одной дозы фазы II у здоровых субъектов, не получавших фоновую терапию статинами, в котором субъекты получали одну дозу mAb316P подкожно (п/к) в дозе 50, 100, 150 и 250 мг или плацебо.

(2) Исследование нескольких доз.

Когортное исследование фазы I пациентов с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (геСГ) и несемейной гиперхолестеринемией (не-СГ), получавших терапию аторвастатином, и пациентов с не-СГ, только соблюдавших диету. Пациенты, принимавшие аторвастатин, получали в порядке рандомизации mAb316P (50, 100 или 150 мг) или плацебо п/к в дни 1, 29 и 43. Пациенты с не-СГ, только соблюдавшие диету, получали в порядке рандомизации mAb316P в дозе 150 мг или плацебо п/к в дни 1 и 29.

(3) Исследование фазы II.

Исследование продолжительностью 12 недель с участием пациентов с гиперхолестеринемией, получавших терапию аторвастатином: пациенты получали в порядке рандомизации mAb316P в дозе 50, 100 или 150 мг п/к один раз в 2 недели (1 р./2 нед.), 200 или 300 мг п/к один раз в 4 недели (1 р./4 нед.) или плацебо.

Результаты.

Однократное введение mAb316P в дозе 150 мг п/к приводило к быстрому связыванию циркулирующего свободного PCSK9 и быстрому снижению его уровней; вслед за этим наблюдалось снижение уровня Х-ЛПНП. Было установлено, что возвращение уровня свободного PCSK9 к исходному значению предшествовало возвращению к исходному значению уровня Х-ЛПНП (фиг. 1). Уровни свободного PCSK9 достигали минимального значения ко дню 3 после введения mAb316P в дозе 50, 100 или 150 мг п/к у пациентов с геСГ или не-СГ (фиг. 2). Возвращение уровней свободного PCSK9 к исходным значениям было более медленным у пациентов, получавших mAb316P в сочетании только с диетой, чем у пациентов, получавших mAb316P в сочетании с аторвастатином (фиг. 2). Наибольшее среднее снижение уровня Х-ЛПНП наблюдалось на день 8 для доз 50 и 100 мг и на день 15 для дозы 150 мг; такое отставание относительно концентраций свободного PCSK9 может быть обусловлено необходимостью образования новых рецепторов к Х-ЛПНП. На фиг. 3 представлена кривая гистерезиса, показывающая взаимосвязь между mAb316P и общим уровнем Х-ЛПНП после введения дозы 150 мг.

Более высокие исходные уровни свободного PCSK9 наблюдались у пациентов, получавших статины, по сравнению с пациентами, только соблюдавшими диету (фиг. 4). При одновременном применении со статинами наблюдалось увеличение опосредованного целевой молекулой клиренса mAb316P (в связи с более высокими уровнями свободного PCSK9, что, вероятно, отражает более высокую скорость его синтеза) по сравнению с клиренсом при сочетании терапии mAb316P только с диетой. По всей видимости, данный эффект влиял на длительность снижения уровня Х-ЛПНП в течение 4-недельного интервала между введениями препарата (с дня 1 по 29), которая сокращалась при одновременном применении исследуемого препарата со статинами по сравнению только с диетой; однако этот эффект не наблюдался в течение 2-недельного интервала между введениями препарата (с дня 29 до 43) (фиг. 5).

У пациентов с гиперхолестеринемией (не-СГ), получавших сопутствующую терапию статинами, введение mAb316P 1 р./2 нед. приводило к равномерно выраженному снижению уровней Х-ЛПНП по прошествии 12 недель. У пациентов, получавших препарат 1 р./2 нед., наблюдалась меньшая вариабельность значений Х-ЛПНП на неделе 12 по сравнению с пациентами, получавшими препарат 1 р./4 нед. (фиг. 6); коэффициент вариации 16% против 49% для дозы 150 мг с введением 1 р./2 нед и дозы 300 мг с введением 1 р./4 нед. соответственно.

Выводы.

Наблюдалась явная связь между введением mAb316P и уровнями свободного PCSK9 и Х-ЛПНП. Применение mAb316P приводило к снижению уровней свободного PCSK9 в течение 3 дней после введения и к максимальному снижению уровней Х-ЛПНП через 8-15 дней после введения.

Клиренс mAb316P увеличивался за счет его связывания со свободным PCSK9 (опосредованный целевой молекулой клиренс). Более низкие уровни свободного PCSK9 приводили к увеличению длительности эффекта исследуемого препарата за счет снижения его опосредованного целевой молекулой клиренса. В проведенных ранее исследованиях было показано, что применение статинов приводит к увеличению синтеза свободного PCSK9. В исследованиях, данные которых были проанализированы в этом документе, у пациентов, получавших mAb316P в сочетании только с диетой, наблюдались более низкие исходные уровни свободного PCSK9 и более высокие концентрации mAb316P в крови по сравнению с пациентами, получавшими mAb316P в сочетании с аторвастатином.

У пациентов, получавших одновременно статины, при введении mAb316P 1 р./2 нед. наблюдалась меньшая вариабельность уровней Х-ЛПНП в конце периода между введениями препарата, чем при вве-

дении mAb316P 1 р./4 нед. При введении препарата 1 р./4 нед. различия между пациентами в опосредованном целевой молекулой клиренсе (помимо других факторов), очевидно, влияли на различие в длительности максимального снижения уровней Х-ЛПНП между неделями 2 и 4 после введения и, таким образом, на более выраженные отличия в эффективности через 4 недели после введения. Эти различия не наблюдались при введении препарата 1 р./2 нед.

Пример 3А. Антитела к PCSK9 снижают содержание холестерина в остаточных фракциях липопротеинов, липопротеинах очень низкой плотности, триглицеридах и липопротеине(а) (Лп(а)) в сыворотке крови.

Введение.

Повышение уровня липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) является частью патогенеза атерогенной дислипидемии, которая предрасполагает к развитию раннего атеросклероза. Остаточные липопротеины являются продуктом липолиза ЛПОНП и включают ЛПОНП₃ и липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), которые являются прямым предшественником ЛПНП.

Липопротеин (а) (Лп(а)) состоит из аполипопротеина(а) (Апо(а)), соединенного ковалентной связью с компонентом апоВ богатого холестерином липопротеина, который имеет приблизительно тот же размер, что и частица липопротеина низкой плотности (ЛПНП). Метаболизм Лп(а) регулируется главным образом на генетическом уровне, при этом на 90% его концентрации в плазме крови влияет качественный и количественный полиморфизм гена apo(a) (LPA). Повышенный уровень Лп(а) считается независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, при этом риск увеличивается по мере повышения уровня Лп(а). Хотя повышенные уровни Лп(а) могут способствовать развитию атеросклероза за счет отложения холестерина в интиму сосуда, они также могут способствовать тромбообразованию вследствие высокого сходства Лп(а) и плазминогена, однако Лп(а) не обладает протеазной активностью. Показано, что у пациентов, которым выполняют коронарографию, концентрации Лп(а) > 30 мг/дл ассоциируются с повышенной частотой выявления стеноза сосуда при ангиографии и тяжелыми коронарными событиями. Также показано, что уровни Лп(а) и генотип ассоциированы с кальцификацией аортального клапана, что указывает на то, что они могут выступать в качестве причинных факторов.

Настоящий пример имел своей целью проверку гипотезы о том, что mAb316P, полностью человеческое моноклональное антитело к пропротеиновой конвертазе субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), снижает уровни Х-ЛПОНП и остаточных липопротеинов в сыворотке крови, приводя к снижению уровней Х-ЛПНП и Х-не-ЛПВП в сыворотке крови, а также подтверждение способности mAb316P снижать уровни Лп(а) у пациентов.

Три многоцентровых, двойных слепых, плацебо-контролируемых исследования в параллельных группах были проведены у пациентов с первичной гиперхолестеринемией (исследование А, n=183; исследование В, n=92) или с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (исследование С, n=77). Обзор дизайнов этих трех исследований и режимов дозирования препарата в них представлен в табл. 1.

Таблица 1. Обзор дизайнов клинических исследований и режимов дозирования mAb316P в них

Исследование	А	В	С
Длительность	12 недель	8 недель	12 недель
Пациенты	Гиперхолестеринемия (n=183)	Гиперхолестеринемия (n=92)	Гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (n=77)
Дозы mAb316P	200-300 мг 1 р./4 нед. 50-100 мг 1 р./2 нед. 150 мг 1 р./2 нед. (n=31)	150 мг 1 р./2 нед. + АТВ в дозе 10-80 мг 150 мг 1 р./2 нед. + АТВ в дозе 10-80 мг (всего n=61)	150, 200, 300 мг 1 р./4 нед. 150 мг 1 р./2 нед. (n=16)
Плацебо	n=31	Плацебо+ АТВ в дозе 10-80 мг (n=31)	n=15
Анализ объединенных данных популяции	mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. (n=108)		Плацебо (n=77)

В исследовании В все пациенты до рандомизации получали аторвастатин (АТВ) в дозе 10 мг, которую затем повышали до 80 мг в начале применения в порядке рандомизации плацебо и mAb316P в соответствующих группах.

Пациенты, получавшие фоновую терапию аторвастатином или статинами в сочетании с эзетимибом или без него, получали mAb316P в дозе 50-300 мг подкожно (п/к) один раз в 2 или 4 недели (1 р./2 нед., 1 р./4 нед.) в зависимости от исследования. Доза mAb316P 150 мг с введением 1 р./2 нед. была одинаковой для всех трех исследований.

При апостериорном анализе липопротеины разделяли на субфракции посредством вертикального автопрофилирования (ВАП). Метод ВАП представляет собой исследование с однократным прямым ультрацентрифугированием, при котором разделяются фракции липопротеинов в соответствии с их плотно-

стью в вертикальном роторе, что обеспечивает разделение в высокой степени для каждого класса и под-класса липопротеинов. Дно пробирки перфорировано и содержание холестерина в каждом слое измеряют с помощью спектрофотометра после добавления реагента для ферментного определения холестерина. У пациентов, получавших mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. или плацебо, на неделе 12 (исследование А), неделе 8 (исследование В) и неделе 6 (исследование С) с помощью ковариационного анализа определяли изменение в процентах уровней Х-ЛПОНП, Х-ЛПОНП₁₊₂ (содержание холестерина в "больших флотирующих" частицах ЛПОНП), триглицеридов (ТГ), Х-ЛПОНП₃, Х-ЛППП и общего холестерина остаточных липопротеинов (Х-ОЛП; Х-ЛПОНП₃ + Х-ЛППП).

Кроме того, у пациентов из трех разных исследований фазы II, получавших mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. или плацебо определяли уровни Лп(а) на исходном уровне и во время лечения. Во всех исследованиях фазы II уровни Лп(а) определяли в одной и той же лаборатории с помощью одного и того же метода. Объединяли данные об уровнях Лп(а) на исходном уровне и в конце лечения (значение во время лечения на неделе 8/12 или последнее имеющееся документированное значение во время лечения) у пациентов из модифицированной начавшей лечение популяции всех трех исследований (популяция mITT), и изменения в процентах от исходного значения при введении mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. и плацебо сравнивали с помощью ковариационного анализа с использованием группы лечения и исследования в качестве фиксированных эффектов и исходного уровня Лп(а) в качестве ковариаты. Р-значения, связанные с поисковым анализом, представлены только с описательной целью и не подвергались корректировке на множественность сравнений. Взаимосвязи между изменениями в процентах относительно исходного значения уровней Лп(а) и Х-ЛППП оценивали методом линейной регрессии и рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена.

Результаты/выводы.

В 3 указанных исследованиях при применении mAb316P по сравнению с плацебо наблюдалось снижение уровней ТГ, Х-ЛПОНП и содержания холестерина в остаточных липопротеинах. Результаты обобщены в табл. 2 и на фиг. 7-9.

Таблица 2

	Значение на исходном уровне (мг/дл)	Значение в конце лечения (мг/дл)	Изменение в процентах	р-значение (-я)
ЛПОНП	От 23,24 до 26,31	От 16,62 до 18,12	От -22,33 до -27,95	От 0,0023 до <0,0001
Х-ЛПОНП ₁₊₂	От 9,79 до 10,59	От 6,59 до 7,31	От -21,87 до -31,45	От 0,0178 до <0,0001
ЛПОНП ₃	От 13,55 до 15,62	От 10,03 до 10,88	От -21,9 до -26,66	От 0,0011 до <0,0001
ТГ	От 135,72 до 157,19	От 99,9 до 124,44	От -13,07 до -21,19	От 0,6945 до 0,0003
ЛППП	От 15,38 до 22,06	От 6,79 до 8,62	От -50,28 до -55,75	<0,0001
Х-ОЛП	От 29,34 до 37,69	От 16,86 до 19,5	От -37,05 до -44,04	<0,0001

У пациентов с ге/СГ/не-СГ на фоне применения липидоснижающей терапии (статины ± эзетимиб) при введении mAb316P наблюдалось снижение уровней всех атерогенных липопротеинов (Х-ЛПНП, Х-ЛППП, Х-ЛПОНП и субфракций ОЛП). Данный пример показывает, что препарат mAb316P существенно снижал уровни Х-ЛПОНП и ТГ в сыворотке крови, а также существенно снижал содержание холестерина в остаточных фракциях липопротеинов, разделенных методом ВАП, включая Х-ЛПОНП₃ и Х-ЛППП.

Данные о концентрации Лп(а) на исходном уровне и во время лечения имелись для 102 из 108 пациентов, получавших mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед., и 74 из 77 пациентов, получавших плацебо в популяции анализа объединенных данных. Исходные значения показаны в табл. 3.

Таблица 3. Исходные уровни Лп(а) у пациентов, данные которых были включены в объединенный анализ

Значения Лп(а) в мг/дл		
	Плацебо (n=74)	mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. (n=102)
Вся популяция, медиана (ИКР)	19,0 (6,0-77,0)	29,5 (8,0-70,0)
Диапазон	1,5-299,0	1,5-181,0
Число пациентов, разделенных на подгруппы исходным уровнем Лп(а)		
	Плацебо (n=74)	mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. (n=102)
≤50 мг/дл, n (%)	49 (66,2)	68 (66,7)
>50 мг/дл, n (%)	25 (33,8)	36 (35,3)

* Пациенты из популяции mITT с доступными данными по концентрации Лп(а) на исходном уровне и в конце лечения (значение во время лечения на неделе 8/12 или последнее имеющееся документированное значение во время лечения).

Как показано в табл. 3, у 36 пациентов (35%), получавших mAb316P, и у 25 пациентов (33%), получавших плацебо, исходные уровни Лп(а) составляли > 50 мг/дл, и это значение считалось пограничным значением для отнесения пациентов в группу высокого риска согласно рекомендациям EAS.

Медианы значений снижения концентрации Лп(а) относительно исходного значения в абсолютном и процентном измерении приведены в табл. 4.

Таблица 4. Изменение уровня Лп(а) от исходного значения

Все пациенты		Число пациентов, разделенных на подгруппы по исходному уровню Лп(а)			
		≤50 мг/дл		>50 мг/дл	
Все пациенты, получавшие плацебо (n=74)	Все пациенты, получавшие mAb316P (n=102)	Все пациенты, получавшие плацебо (n=49)	Все пациенты, получавшие mAb316P (n=68)	Все пациенты, получавшие плацебо (n=25)	Все пациенты, получавшие mAb316P (n=34)
Медиана изменения уровня Лп(а) от исходного значения, мг/дл (ИКР; использование последних данных вместо недостающих)					
-0,5 (-5,0-2,0)	-9,0 (-19,0- -2,0)*	0,0 (-3,0-1,5)	-3,5 (-11,5- -1,5)*	-5,0 (-11,0-6,0)	-26,5 (-39,0- -16,0)*
Медиана изменения уровня Лп(а) в процентах от исходного значения, мг/дл (ИКР; использование последних данных вместо недостающих)					
-0,3% (-16,7-11,5)	-30,3% (-50,0- -19,4)*	0,0% (-16,7-16,7)	-36,1% (-51,1- -17,4)*	-4,4% (-9,4-7,1)	-27,0% (-32,6- -19,6)*

*P<0,0001 по сравнению с плацебо.

Как показано в табл. 4, медиана изменения уровня Лп(а) в процентах от исходного значения составляла -30,3% при применении mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. по сравнению с -0,3% при применении плацебо (P<0,0001). Медианные значения снижения уровня Лп(а) от исходного значения в абсолютном измерении были значительно выше у пациентов с исходно более высокими уровнями Лп(а). Подводя итог вышесказанному, анализ объединенных данных из трех исследований фазы II, в которых пациенты получали mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед., показал существенное снижение уровней Лп(а) по сравнению с плацебо у пациентов с исходным уровнем Лп(а) > 50 мг/дл. У пациентов, отнесенных в группу более высокого риска сердечно-сосудистых заболеваний вследствие повышенного уровня Лп(а), снижение уровней Лп(а) в процентном отношении имело схожую степень, что приводило к более выраженному снижению уровней Лп(а) в абсолютном измерении.

Пример 3Б. Антитела к PCSK9 снижают уровни аполипопротеинов СII и СIII в сыворотке крови.

Введение.

Аполипопротеин (Апо) СIII ингибирует катаболизм триглицеридов ЛПОНП, опосредованный липопротеиновой липазой (ЛПЛ). По всей видимости, Апо СII имеет более сложную связь с активностью ЛПОНП и ЛПЛ, которая может зависеть от исходного уровня триглицеридов. В целом, Апо СII является важным активатором ЛПЛ.

ЛПЛ гидролизует триглицериды ЛПОНП и их остатки. В этом примере изучалась способность антитела к PCSK9, mAb316P, снижать уровни X-ЛПОНП и остаточных липопротеинов путем воздействия на уровни аполипопротеинов СII и СIII в сыворотке крови.

Три многоцентровых, двойных слепых, плацебо-контролируемых исследования в параллельных группах были проведены на пациентах с первичной (несемейной) гиперхолестеринемией (не-СГ) (исследование А, n=183; исследование В, n=92) или с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (геСГ)

(исследование С, n=77). Пациенты (получавшие аторвастатин или статины в сочетании с эзетимибом или без него) получали mAb316P в дозе 50-150 мг один раз в 2 недели (1 р./2 нед.) или в дозе 150-300 мг один раз в 4 недели (1 р./4 нед.) в зависимости от исследования. Доза mAb316P 150 мг с введением 1 р./2 нед. была одинаковой для всех трех исследований (см. пример 3А, табл. 1).

При апостериорном анализе концентрации Апо СII и СIII измеряли методом иммуноанализа (с использованием комплектов реагентов производства компании Randox Laboratories Limited, Великобритания (Апо СII, кат. № LP3866; Апо СIII, акт. № LP3865) и анализатор Architect Ci8200 [Abbott Laboratories, IL]). В основе методов иммуноанализа лежит реакция образца, содержащего человеческий Апо СII (или Апо СIII) и специфической антисыворотки к Апо СII (или СIII), при которой формируется нерастворимый комплекс, концентрацию которого можно измерить турбидиметрическим методом при длине волны 340 нм. Аналитические характеристики обоих методов иммуноанализа были валидированы.

Изменение в процентах от исходного значения концентраций Апо СII и Апо СIII у пациентов в группе плацебо сравнивалось с таковым у пациентов, получавших mAb316P, при этом ковариационный анализ выполняли на неделе 12 (исследование А), неделе 8 (исследование В) и неделе 6 (исследование С). В исследовании С конечной точкой была неделя 12; однако использовались данные за 6 недель в связи с уменьшенным числом пациентов, образцы крови которых сохранялись до недели 12 (n=17), по сравнению с неделей 6 (n=75).

Результаты.

Изменения в процентах концентрации Апо СII и Апо СIII от исходного значения для группы пациентов, получавших mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. в исследованиях А, В и С, показаны в табл. 5. Значения показаны в виде среднего (СО) за исключением Апо СIII, для которого значения представлены в виде медианы (ИКР). Данные представлены за неделю 12 (исследование А), неделю 8 (исследование В) и неделю 6 (исследование С). На фиг. 13 показано изменения концентрации Апо СII в зависимости от дозы препарата (часть А) и Апо СIII (часть В) для исследования А.

Таблица 5

Исследование А	Апо СII % изменение	р-значение по сравнению с плацебо	Апо СIII % изменение	р-значение по сравнению с плацебо
Плацебо	12,0 (33,0)		3,76 (от -5,5 до 27,6)	
mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед.	-21,4 (26,5)	<0,00001	-24,7 (от -28,4 до -2,9)	<0,00001
Исследование В				
Плацебо	-10,6 (30,2)		-7,0 (от 29,8 до 7,3)	
mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. + аторвастатин в дозе 10 мг	-10,0 (22,7)	0,98	-4,9 (от -24,4 до 1,0)	0,4426
mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. + аторвастатин в дозе 80 мг	-29,3 (19,29)	0,0067	-22,9 (от -28 до -14,0)	0,0165
Исследование С				
Плацебо	1,6 (15,5)		-3,3 (от -15,3 до 5,6)	
mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед.	-9,4 (28,1)	0,0794	-20,2 (от -29,0 до 2,5)	0,019

Препарат mAb316P снижал уровни Апо СII и СIII при всех дозах, однако наблюдалась явная зависимость их уровней от дозы (табл. 5, фиг. 13). Во всех трех исследованиях mAb316P снижал уровни Апо СII у пациентов относительно исходного значения (табл. 5). Среднее снижение относительно исходных значений на неделе 12 (исследование А), неделе 8 (исследование В) и неделе 6 (исследование С) составляло 21,4% (p<0,00001), 29,3% (p=0,0067) и 9,4% (p=0,08) соответственно (р-значения по сравнению с плацебо). Содержание Апо СIII снизилось на 24,7% (p<0,00001), 22,9% (p=0,017) и 20,2% (p=0,019) в исследованиях А, В и С соответственно (р-значения по сравнению с плацебо).

Выводы.

Терапия антителом к PCSK9 (mAb316P) приводила к значительному снижению концентрации Апо СII и СIII в сыворотке крови. У пациентов с не-СГ наблюдалось снижение концентрации Апо СII и СIII в соотношении почти 1:1. У пациентов с геСГ снижение концентрации Апо СIII превышало снижение концентрации Апо СII приблизительно в два раза. Снижение концентрации Апо СII и СIII может быть проявлением либо увеличения клиренса, либо снижения образования/секреции частиц ЛПОНП, которые являются носителями этих аполипопротеинов.

Пример 4. Антитело к PCSK9 снижает концентрации холестерина во всех фракциях липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови.

Введение.

Холестерин липопротеинов низкой плотности (Х-ЛПНП) состоит из совокупности частиц ЛПНП различной плотности, находящихся на различной стадии липидации. Анализ эффектов липидмодифицирующей терапии на состав частиц ЛПНП может оказаться полезным для понимания механизмов действия используемых препаратов. Настоящий пример имел своей целью проверку гипотезы о том, что mAb316P, полностью человеческое моноклональное антитело к пропротеиновой конвертазе субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), снижает уровни Х-ЛПНП за счет снижения содержания холестерина в различных фракциях ЛПНП.

Три многоцентровых, двойных слепых, плацебо-контролируемых исследования в параллельных группах были проведены у пациентов с первичной гиперхолестеринемией (исследование А, n=183; исследование В, n=92) или с гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (исследование С, n=77). Пациенты (получавшие аторвастатин или статины в сочетании с эзетимибом или без него) получали mAb316P в дозе 50-150 мг один раз в 2 недели (1 р./2 нед.) или в дозе 150-300 мг один раз в 4 недели (1 р./4 нед.) в зависимости от исследования. Доза mAb316P 150 мг с введением 1 р./2 нед. была одинаковой для всех трех исследований (см. пример 3А, табл. 1).

При апостериорном анализе липопротеины разделяли на субфракции посредством вертикального автопрофилирования (ВАП). Изменение в процентах уровней Х-ЛПНП₁ ("большой флотирующий" ЛПНП), Х-ЛПНП₂, Х-ЛПНП₃ и Х-ЛПНП₄ ("малый плотный" ЛПНП) относительно исходного значения у пациентов, получавших mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед., по сравнению с плацебо на неделе 12 для исследования А, неделе 8 для исследования В и неделе 6 для исследования С анализировали методом ковариационного анализа. Данные по фракциям Х-ЛПНП₃ и Х-ЛПНП₄ анализировали по отдельности и вместе. Такой подход использовался в связи с тем, что Х-ЛПНП₄ обычно присутствует в значительно меньших концентрациях, чем Х-ЛПНП_{3,4}. Снижение в процентах уровня Х-ЛПНП₄ было более вариабельным. Сумма Х-ЛПНП₃₊₄ представляет собой сумму двух наименьших фракций Х-ЛПНП с наибольшей плотностью.

Результаты/выводы.

Во всех 3 исследованиях у пациентов, получавших mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед., наблюдалось существенное снижение содержания холестерина во всех субфракциях ЛПНП относительно исходного значения при их разделении методом ВАП по сравнению с плацебо. Результаты обобщены в табл. 6 и на фиг. 10-12.

Таблица 6

	Значение на исходном уровне (мг/дл)	Значение в конце лечения (мг/дл)	Изменение в процентах	р-значение
ЛПНП ₁	От 16,18 до 25,92	От 3,56 до 6,81	От -68,87 до -77,84	<0,0001
ЛПНП ₂	От 20,29 до 31,46	От 3,04 до 7,84	От -77,85 до -84,17	<0,0001
ЛПНП ₃₊₄	От 46,33 до 49,16	От 14,9 до 22,29	От -48,77 до -68,49	<0,0001

Таким образом, этот пример показывает, что терапия моноклональным антителом к PCSK9 (mAb316P) приводит к существенному снижению содержания холестерина во фракциях ЛПНП при их разделении методом ВАП. Показанное ранее снижение концентрации Х-ЛПНП при применении mAb316P было подтверждено для всего спектра субфракций Х-ЛПНП.

Пример 5. Влияние антитела к PCSK9 на концентрацию частиц липопротеинов.

Вводная информация.

Содержание холестерина в частицах липопротеинов низкой плотности (Ч-ЛПНП) и частицах липопротеинов высокой плотности (Ч-ЛПВП) может существенно различаться у разных лиц. Например, у одного лица могут присутствовать более крупные и богатые холестерином Ч-ЛПНП, а у другого - более мелкие и небогатые холестерином Ч-ЛПНП. В связи с этим уровни холестерина липопротеинов низкой плотности (Х-ЛПНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (Х-ЛПВП) в сыворотке крови часто не коррелируют с количеством циркулирующих Ч-ЛПНП и Ч-ЛПВП.

Эпидемиологические исследования показали, что риск возникновения атеросклеротического заболевания сердечно-сосудистой системы коррелирует с содержанием Х-ЛПНП и Ч-ЛПНП. Однако показано, что в популяциях пациентов, в которых эти показатели не соответствуют друг другу (например, пациенты с сахарным диабетом или метаболическим синдромом), риск более последовательно коррелирует с содержанием Х-ЛПНП и Ч-ЛПНП. В связи с этим множество экспертов и руководств поддерживают

дополнительное использование Ч-ЛПНП в качестве терапевтической мишени у пациентов с высоким риском.

Метод ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) позволяет точно измерять количество циркулирующих частиц липопротеинов для выявления пациентов с несоразмерно высокими уровнями Ч-ЛПНП, требующих более интенсивной терапии.

Показано, что антитело к PCSK9 (mAb316P) снижало уровни Х-ЛПНП до 72,4% у пациентов, получавших аторвастатин в стабильной дозе в течение 12 недель, при этом частота возникновения нежелательных явлений в группе плацебо и группе mAb316P была схожей. Препарат mAb316P снижал уровни аполипопротеина В до 56% пропорционально снижению уровня Х-ЛПНП. В связи с этим влияние mAb316P на количество частиц липопротеинов у пациентов с гиперхолестеринемией не установлено.

Настоящий пример рассматривает методы оценки воздействия mAb316P на содержание и размер частиц липопротеинов.

Методы.

Было проведено подисследование в рамках двойного слепого рандомизированного исследования фазы II с участием пациентов с уровнем Х-ЛПНП ≥ 100 мг/дл, получавших плацебо (n=31) или mAb316P в дозе 150 мг подкожно (п/к) один раз в 2 недели (1 р./2 нед.) (n=28) в дополнение к терапии аторвастатином в стабильной дозе (10, 20 или 40 мг в сутки). Содержание липидов и липопротеинов определяли в образцах крови, взятых у пациентов утром натощак через 12 ч после последнего употребления пищи. Профили частиц липопротеинов определяли методом ЯМР-спектроскопии с использованием алгоритма LipoProfile-3 компании LipoScience, Inc. (Raleigh, NC). Количественное определение подклассов Ч-ЛПНП и Ч-ЛПВП выполняли на основании амплитуд их спектроскопически отличающихся ЯМР-сигналов для липидных метильных групп и средневзвешенные размеры ЛПНП и ЛПВП получали из суммы диаметров частиц каждого подкласса, умноженной на их относительный массовый процент на основании амплитуды ЯМР-сигналов метильных групп.

Ниже следуют оценочные показатели диапазона диаметра частиц названных подклассов.

Ч-ЛПОНП: малые Ч-ЛПОНП=от 29 до 42 нм; средние Ч-ЛПОНП=от 42 до 60 нм; большие Ч-ЛПОНП > 60 нм;

Ч-ЛПНП: малые Ч-ЛПНП=от 18 до 20,5 нм; большие Ч-ЛПНП=от 20,5 до 23 нм; частицы липопротеинов промежуточной плотности (Ч-ЛППП)=от 23 до 29 нм;

Ч-ЛПВП: малые Ч-ЛПВП=от 7,3 до 8,2 нм; средние Ч-ЛПВП=от 8,2 до 9,4 нм; большие Ч-ЛПВП=от 9,4 до 14 нм.

Общее содержание Ч-ЛПОНП, Ч-ЛПНП и Ч-ЛПВП соответствует сумме концентраций количества частиц подклассов ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП соответственно. Конечными точками анализа были процентные изменения содержания Ч-ЛПНП, Ч-ЛПОНП и Ч-ЛПВП от исходного значения на неделе 12.

Те переменные, которые не были распределены обычным образом, трансформировали для всех статистических критериев, а нетрансформированные переменные представлены в таблице в этом документе. Средние значения (стандартного отклонения (СО)) представлены для непрерывных переменных с нормальным распределением, тогда как для всех переменных, не распределенных обычным образом представлены медианные значения (интерквартильный размах (ИКР)). Количество и процентные значения выражены в виде индикаторных переменных. Для определения статистически значимых отличий показателей в группе лечения от показателей в группе плацебо использовали точный критерий Фишера и регистрировали полученные р-значения. Для определения статистически значимых отличий показателей в каждой группе лечения от показателей в группе плацебо использовали t-критерий и регистрировали полученные р-значения. Для определения статистически значимых отличий в процентных изменениях от исходного значения на неделе 12 для плацебо по сравнению с группами лечения выполняли ковариационный анализ с использованием исходного значения в качестве ковариаты.

Результаты.

В табл. 7 показано содержание частиц липопротеинов до и после введения mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. по сравнению с плацебо.

Таблица 7. Концентрация частиц липопротеинов (нмоль/л) для плацебо (n=31) и mAb316P в дозе 150 мг при введении 1 р./2 нед. (n=28)

Среднее (СО) или медиана (Q1:Q3) (доля от общего значения)		ПЛАЦЕБО		
		Исходный уровень	Неделя 12	% изменение
ЛПНП	Общий ЛПНП	1422,5 (321,3)	1383,8 (327,9)	-1,0%
	Липопротеин промежуточной плотности	110 (51:166,5)	57 (24,5:144,5)	-15,0%
	Большой ЛПНП	546,6 (205,3)	431,8 (217,4)	-21,8%
	Малый ЛПНП	755,3 (304,9)	847,6 (375,1)	17,8%
ЛПОНП + хиломикрон	Общий ЛПОНП + хиломикрон	61,9 (47,8:95,6)	83,9 (45:102,2)	33,4%
	Большой ЛПОНП + хиломикрон	3,5 (2,1:8,5)	4,3 (1,8:9,4)	14,3%
	Средний ЛПОНП	19,3 (13,1:33,9)	33,1 (13,1:51,9)	24,0%
	Малый ЛПОНП	35,3 (28,2:47,8)	37,3 (23,4:56,3)	21,4%
ЛПВП	Общий ЛПВП	32,9 (6,4)	33,2 (7,4)	1,4%
	Большой ЛПВП	3,8 (2,0)	3,9 (2,2)	6,99%
	Средний ЛПВП	9,2 (5,9:14,4)	8 (5,4:10,2)	-13,9%
	Малый ЛПВП	18,8 (5,3)	21,3 (5,8)	18,4%
		mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед.		

		Исходный уровень	Неделя 12	% изменение
ЛПНП	Общий ЛПНП	1320 (304,0)	475,4 (167,3) †	-63,3%
	Лipopротейн промежуточной плотности	84,5 (33:115)	37 (12:66) *	-52,8%
	Большой ЛПНП	532,2 (212,9)	152,4 (107,6) †	-71,3%
	Малый ЛПНП	666,5 (333,8)	279,9 (191,0) †	-54,0%
ЛПОНП + хиломикрон	Общий ЛПОНП + хиломикрон	71,5 (36,9:94,1)	42,0 (30,5:54,1) †	-36,4%
	Большой ЛПОНП + хиломикрон	3,6 (1,8:8,5)	3,1 (1,7:6,9)	5,37%
	Средний ЛПОНП	18,3 (10,7:50)	14,4 (8,2:26,9) †	-38,92%
	Малый ЛПОНП	35,7 (25:49,5)	21,4 (19,9:26,7) *	-33,4%
ЛПВП	Общий ЛПВП	32,6 (6,3)	36,1 (6,5) *	11,2%*
	Большой ЛПВП	4,8 (3,1)	6,1 (3,5) *	44,6%
	Средний ЛПВП	7,8 (5,6:10,7)	9,8 (6,6:11,3)	17,65%
	Малый ЛПВП	19,4 (4,1)	20,0 (5,7) *	2,8%

*P<0,05; † P<0,0001 по сравнению с плацебо.

Среднее снижение уровня Ч-ЛПНП составляло 63% при применении mAb316P и 1% при применении плацебо (P<0,0001), а медиана уровня Ч-ЛПОНП снизилась на 36% при применении mAb316P и повысилась на 33% при применении плацебо (P<0,0001). Уровни Ч-ЛПВП повысились на 11% после введения mAb316P и на 1% после введения плацебо (P<0,05). Направленность изменений по всем подклассам частиц была схожей.

Выводы.

Препарат mAb316P существенно снижал уровни Ч-ЛПНП и других частиц липопротеинов, при этом данное снижение было схожим с уже известным воздействием mAb316P на уровни на X-ЛПНП и аполипопротеина В.

Пример 6. Влияние антитела к PCSK9 на концентрацию субфракций липопротеинов по методу определения подвижности ионов.

Вводная информация.

В клинических исследованиях фазы II показано, что препарат mAb316P (также известный как алироцумаб) существенно снижает уровни холестерина липопротеинов низкой плотности (Х-ЛПНП). Уровень Х-ЛПНП тесно коррелирует с риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), и уровень субфракций ЛПНП, определенных согласно размеру и плотности частиц, также коррелирует в различной степени с увеличением риска возникновения ССЗ. Анализ субфракций липопротеинов позволит лучше понять оценку риска возникновения ССЗ и результатов липидоснижающей терапии у отдельных пациентов.

Методы.

Было проведено двойное слепое рандомизированное клиническое исследование фазы II пациентов с гиперхолестеринемией и уровнями Х-ЛПНП ≥ 100 мг/дл, в котором 31 пациент получал плацебо и 27 пациентов получали алироцумаб в дозе 150 мг один раз в 2 недели (1 р./2 нед.) путем подкожной инъекции с помощью автоматического инъектора в объеме 1 мл в дополнение к терапии аторвастатином в стабильной дозе (10-40 мг в сутки). В данном подисследовании уровни субфракций липопротеинов определяли на исходном уровне и на неделе 12 с помощью метода определения подвижности ионов.

Результаты.

Изменения в уровнях субфракций липопротеинов и липидных параметрах от исходного значения на неделе 12 приведены в табл. 8А (плацебо) и табл. 8В (mAb316P).

Таблица 8А. Плацебо

Субфракции липопротеинов			
	Исходный уровень	Неделя 12	Изменение в процентах
ЛПОНП + ЛППП + общий ЛПНП	1648,44 (453,5)	1728,88 (434,58)	8,25
ЛПОНП (малый + средний + большой)	134,97 (от 109,01 до 152,85)	140,48 (от 106,18 до 193,49)	6,64
ЛППП (ЛППП 1 + 2)	314,28 (от 282,74 до 407,95)	303,35 (от 277,99 до 376,17)	-3,3
Общий ЛПНП	1172,99 (362,85)	1233,76 (331,13)	8,8
Большой ЛПНП (ЛПНП 1 + 2а)	448,23 (173,52)	419,36 (160,98)	-0,26
Средний ЛПНП (ЛПНП 2б)	233,2 (105,34)	228,92 (88,12)	5,07
Малый ЛПНП (ЛПНП 3а)	195,17 (85,53)	225,98 (105,1)	24,39
Очень малый ЛПНП (ЛПНП 4а+4б+4с+ 3б)	296,4 (91,75)	359,49 (136,92)	24,61
ЛПВП (ЛПВП 2б; ЛПВП 3+2а)	23 532,48 (5392,57)	24 400,97 (5798,21)	0,06
Липидные параметры			
	Исходный уровень	Неделя 12	Изменение в процентах
Х-ЛПНП, мг/дл	130,2 (27,3)	120,5 (27,0)	-5,1
Х-ЛПВП, мг/дл	49,0 (10,3)	48,9 (13,2)	-1,0
ТГ, мг/дл	124,0 (от 92,0 до 187,5)	127,0 (от 98,0 до 197,0)	9,7
Апо-В, мг/дл	108,3 (19,3)	109,2 (27,0)	2,2
Апо-А1, г/л	1,4 (от 1,3 до 1,6)	1,4 (от 1,3 до 1,7)	0,0
Лп(а), г/л	0,2 (от 0,1 до 0,9)	0,2 (от 0,07 до 0,85)	0,0

Таблица 8. mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед.

Субфракции липопротеинов			
	Исходный уровень	Неделя 12	Изменение в процентах (р-значение)
ЛПОНП + ЛППП + общий ЛПНП	1542,82 (435,5)	767,78 (212,39)	-48,68 (<0,0001)
ЛПОНП (малый + средний + большой)	138,17 (от 96,41 до 167,8)	77,2 (от 51,81 до 95,8)	-51,37 (<0,0001)
ЛППП (ЛППП 1 + 2)	309,64 (от 268,32 до 363,95)	155,19 (от 134,05 до 194,5)	-52,29 (<0,0001)
Общий ЛПНП	1078,28 (347,61)	529,35 (171)	-49,84 (<0,0001)
Большой ЛПНП (ЛПНП 1 + 2а)	421,08 (130,03)	152,66 (53,4)	-62,66 (<0,0001)
Средний ЛПНП (ЛПНП 2б)	200,86 (91,4)	78,67 (40,76)	-58,69 (<0,0001)
Малый ЛПНП (ЛПНП 3а)	172,02 (104,89)	79,24 (38,36)	-48,56 (<0,0001)
Очень малый ЛПНП (ЛПНП 4а+4б+4с+ 3б)	284,31 (101,87)	218,77 (55,66)	-17,91 (<0,0001)
ЛПВП (ЛПВП 2б; ЛПВП 3+2а)	23 480,25 (5281,63)	21 888,87 (4515,15)	-0,05 (0,0339)
Липидные параметры			
	Исходный уровень	Неделя 12	Изменение в процентах (р-значение)
Х-ЛПНП, мг/дл	123,9 (26,7)	34,2 (15,6)	-72,4 (<0,0001)*
Х-ЛПВП, мг/дл	53,3 (16,1)	55,1 (14,8)	5,5 (0,570)‡
ТГ, мг/дл	140,5 (от 92,5 до 177,5)	99,0 (от 79,0 до 139,0)	-18,9 (0,0006)‡
Апо-В, мг/дл	101,6 (26,6)	44,1 (14,1)	-56,1 (<0,0001)‡
Апо-А1, г/л	1,5 (от 1,3 до 1,7)	1,6 (от 1,4 до 1,7)	1,4 (0,1524)‡
Лп(а), г/л	0,3 (от 0,1 до 0,6)	0,1 (от 0,05 до 0,41)	-28,6 (<0,0001)‡
* Статистически значимое р-значение по иерархической модели. ‡ Р-значения не корректировались на множественность сравнений и приведены только с описательной целью.			

В табл. 8А и 8В приведены изменения в содержании субфракций липопротеинов и липидов в группе плацебо и группе mAb316P в дозе 150 мг 1 р./2 нед. соответственно от исходного значения на неделе 12. По сравнению с плацебо mAb316P снижал уровни липопротеина очень низкой плотности (ЛПОНП) + липопротеина промежуточной плотности (ЛППП) + общего ЛПНП на 48,7% ($p < 0,0001$), ЛПОНП на 51,4% ($p < 0,0001$), ЛППП на 52,3% ($p < 0,0001$) и общего ЛПНП на 49,8% ($p < 0,0001$); направленность изменений уровней других субфракций была схожей. Существенных изменений в уровне ЛПВП не наблюдалось. Имело место статистически высокозначимое различие между снижением в процентах уровня очень малых ЛПНП по сравнению с другими фракциями ЛПНП ($p < 0,0001$).

Выводы.

Согласно методу определения подвижности ионов mAb316P существенно снижал уровни субфракций ЛПНП при добавлении к терапии аторвастатином в стабильной дозе, что соответствует уже известному его воздействию на X-ЛПНП.

Применение изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления изобретения, описанными в этом документе. Более того, различные модификации данного изобретения, помимо модификаций, описанных в этом документе, будут очевидны специалистам в рассматриваемой области, исходя из вышеупомянутого описания и сопровождающих текст фигур. Предполагается, что такие модификации попадают в сферу охвата приложенной формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения концентрации холестерина липопротеинов промежуточной плотности (X-ЛППП) в сыворотке крови у пациента, включающий отбор пациента с повышенным уровнем X-ЛППП в сыворотке крови и введение ему фармацевтической композиции, содержащей ингибитор пропротеино-вой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9), где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, которые специфически связывают PCSK9 и содержат определяющие комплементарность участки тяжелой и легкой цепи (CDR), имеющие SEQ ID NO: 76, 78, 80, 84, 86 и 88.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит от 20 до 200 мг ингибитора PCSK9.

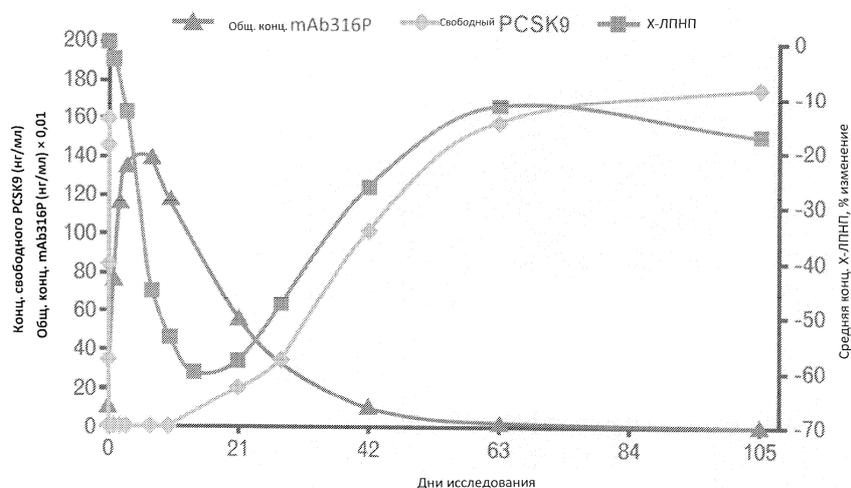
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция содержит 75 или 150 мг ингибитора PCSK9.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90 и область LCVR с аминокислотной последовательностью с SEQ ID NO: 92.

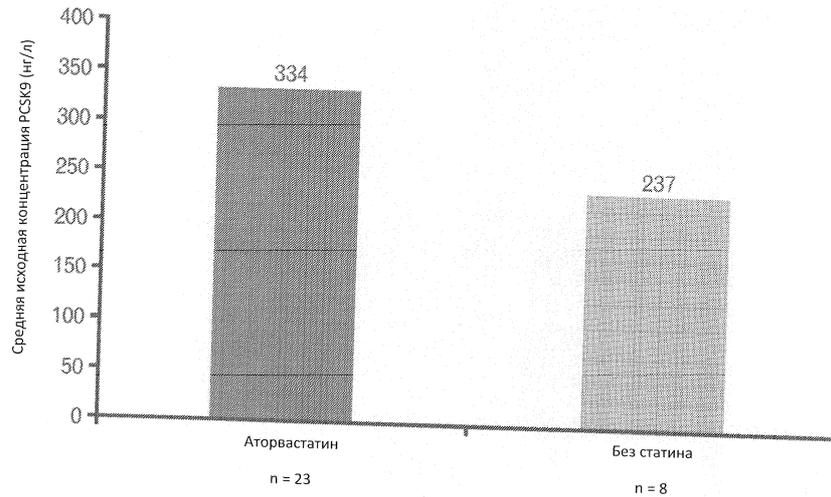
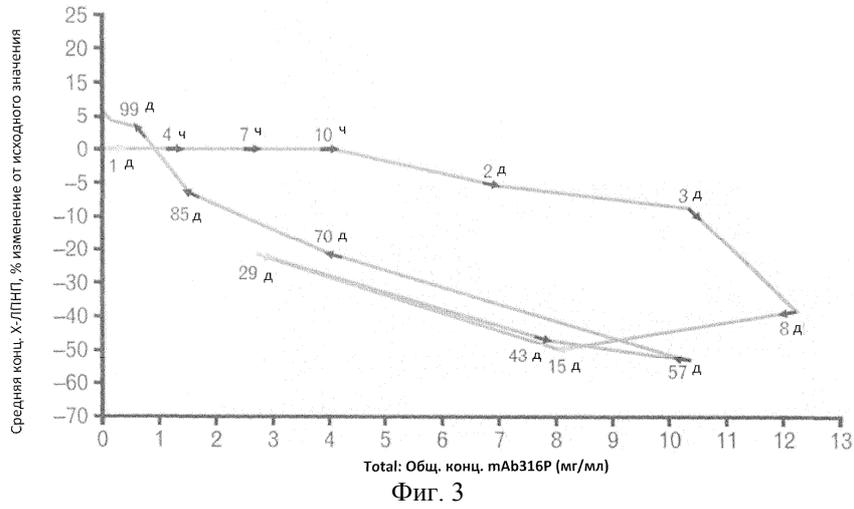
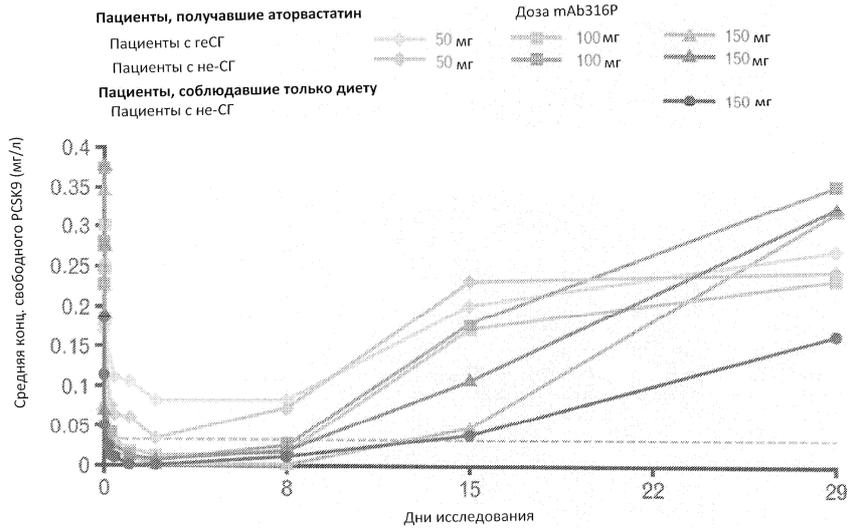
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что пациент получает лечение статинами на момент введения фармацевтической композиции или получал непосредственно до ее введения, где лечение статинами включает статины, выбранный из группы, состоящей из церивастатина, аторвастатина, симвастатина, питевастатина, розувастатина, флувастатина, ловастатина и правастатина.

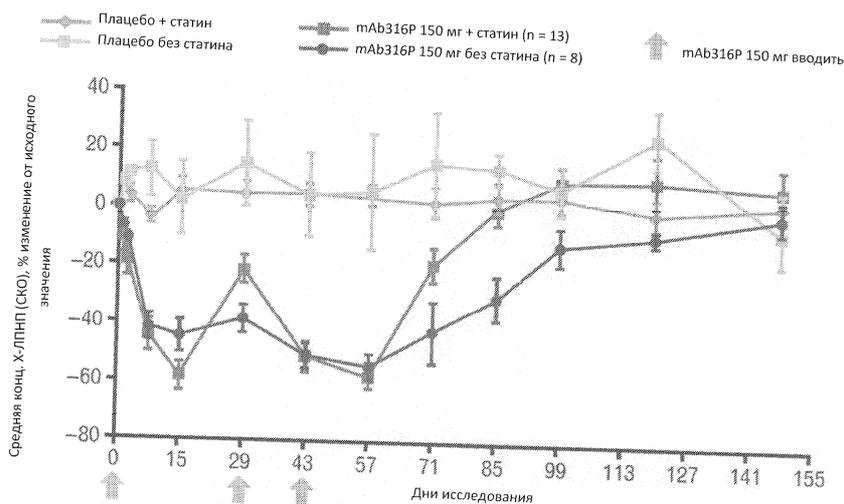
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что статином является аторвастатин.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что пациент не получает лечение статинами на момент введения фармацевтической композиции.

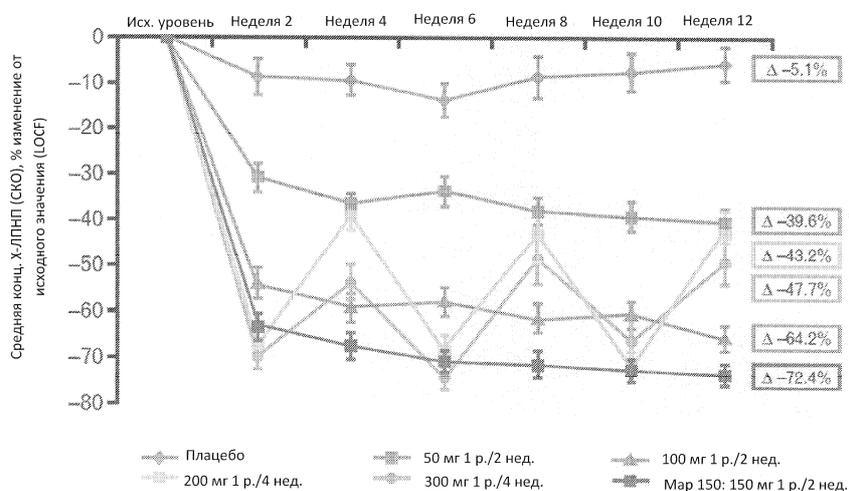


Фиг. 1



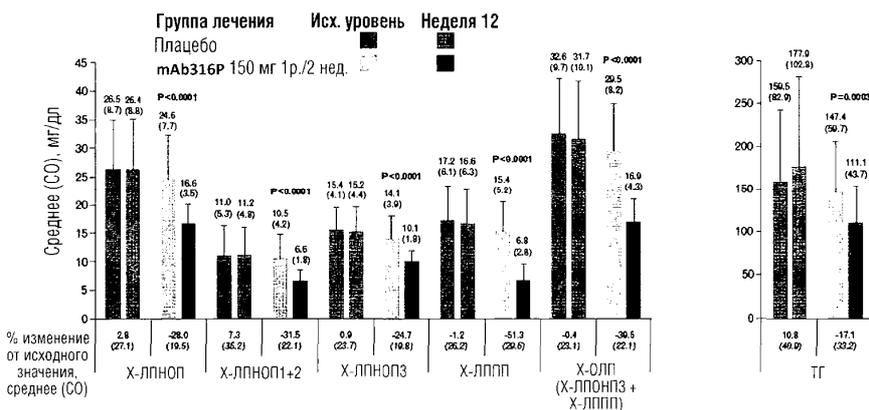


Фиг. 5



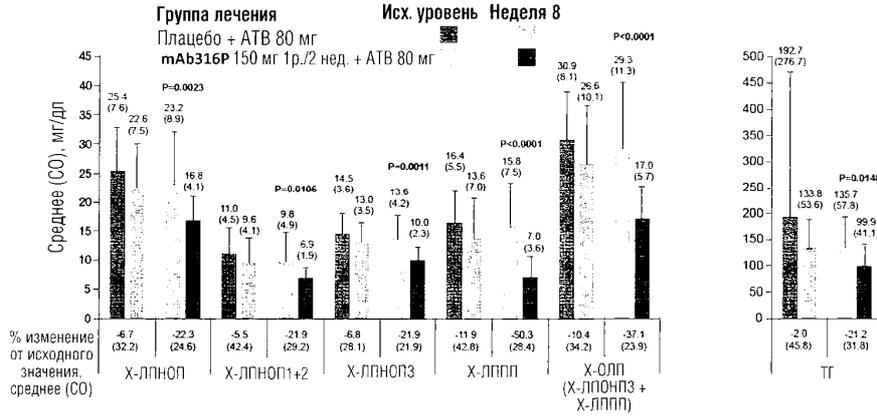
Фиг. 6

Исследование А



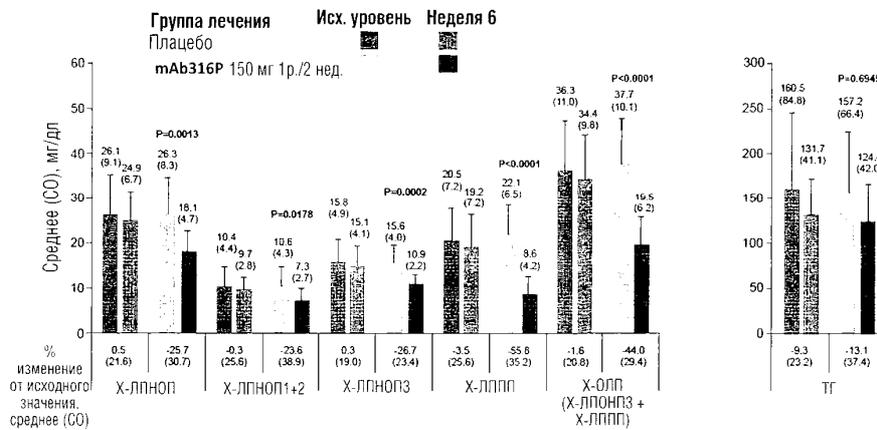
Фиг. 7

Исследование В



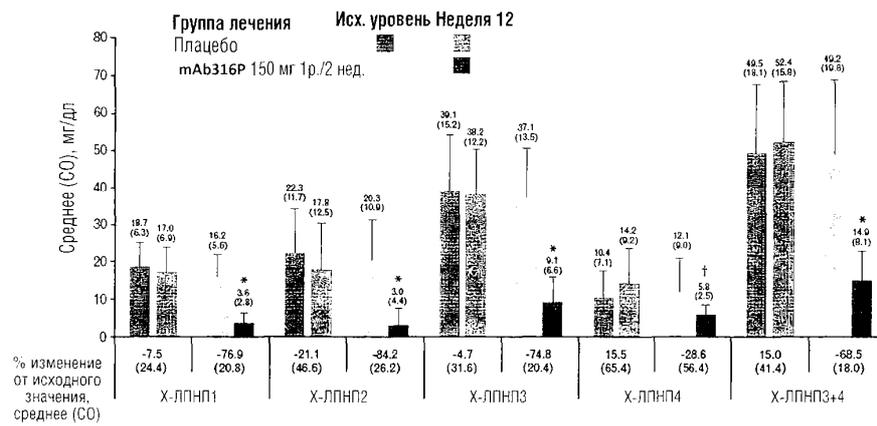
Фиг. 8

Исследование С



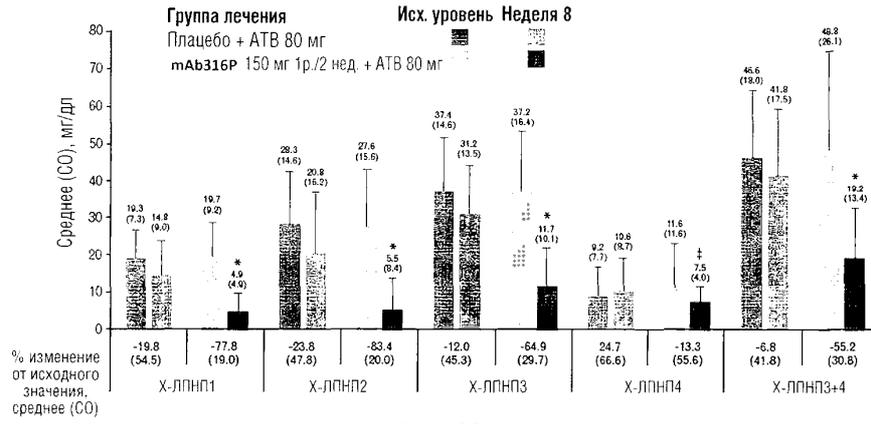
Фиг. 9

Исследование А



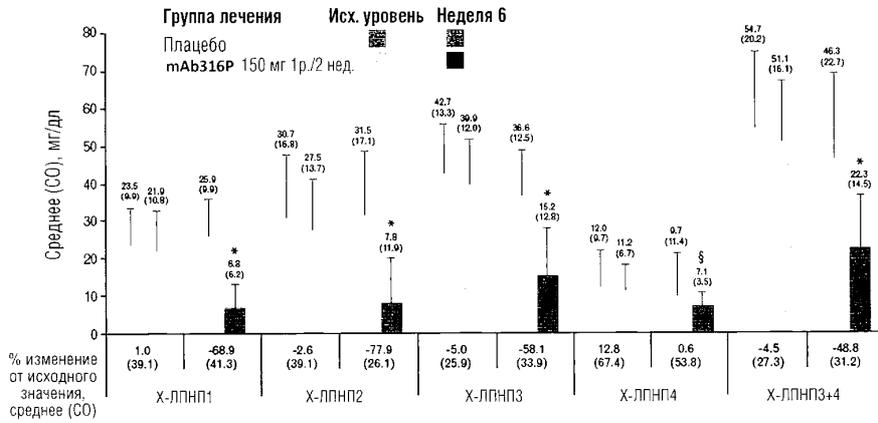
Фиг. 10

Исследование Б

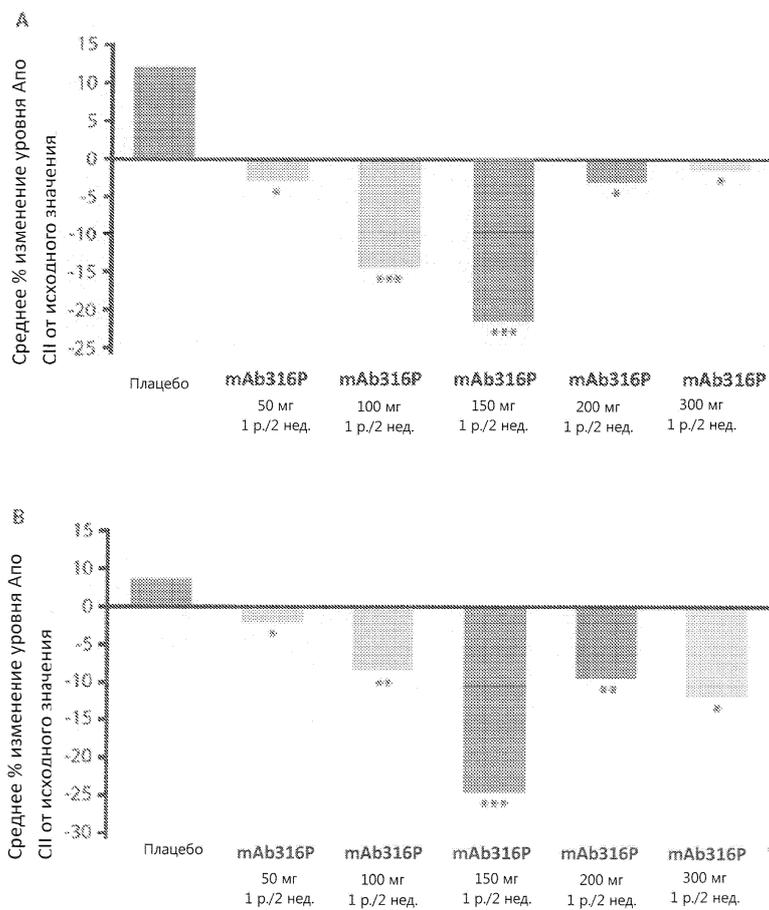


Фиг. 11

Исследование В



Фиг. 12



Фиг. 13

