

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040975**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.25

(21) Номер заявки
201891853

(22) Дата подачи заявки
2017.02.13

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

**(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА ПУТЕМ
ВВЕДЕНИЯ ИНГИБИТОРА ANGPTL3**

(31) 62/296,110

(32) 2016.02.17

(33) US

(43) 2019.01.31

(86) PCT/US2017/017640

(87) WO 2017/142832 2017.08.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Громада Джеспер, Гусарова Виктория,
Мерфи Эндрю Дж. (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012174178
VIKTORIA GUSAROVA ET AL.:
"ANGPTL3 blockade with a human monoclonal
antibody reduces plasma lipids in dyslipidemic mice
and monkeys", JOURNAL OF LIPID RESEARCH,
vol. 56, no. 7, 29 July 2015 (2015-07-29), pages
1308-1317, XP055363055, US, ISSN: 0022-2275,
DOI: 10.1194/jlr.M054890, abstract, page 1309, left-
hand column, paragraph 1, page 1316, left-hand
column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 1
S. KUHNAST ET AL.: "Alirocumab inhibits
atherosclerosis, improves the plaque morphology, and
enhances the effects of a statin", JOURNAL OF
LIPID RESEARCH, vol. 55, no. 10, 1 October
2014 (2014-10-01), pages 2103-2112, XP055363059,
US, ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/jlr.M051326,
abstract

WO-A2-2011085271
WO-A2-2008073300

(57) Изобретение относится к способам и композициям для лечения или предотвращения атеросклероза у пациента. Способы по настоящему изобретению включают введение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка-3 (ANGPTL3) пациенту, который имеет атеросклероз или подвержен риску развития атеросклероза. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3.

B1**040975****040975 B1**

Комментарий по поводу последовательностей

Заявка на данное изобретение содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 8 февраля 2017 г., называется 0431_23-PCT_SL.txt и имеет размер 14141 байт.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области терапевтического лечения атеросклеротических заболеваний и связанных с ними расстройств. Более конкретно, изобретение относится к применению ингибиторов ANGPTL3 для лечения или предотвращения атеросклероза, а также к способам устранения или уменьшения образования атеросклеротических бляшек и/или атеросклеротических поражений у пациента.

Уровень техники

Атеросклероз - синдром, характеризующийся поражением кровеносных сосудов. Атеросклероз является результатом хронической воспалительной реакции в артериальных стенках и является основной причиной смерти и заболеваемости сердечно-сосудистыми заболеваниями. Атеросклероз включает в себя утолщение стенок артерий и характеризуется развитием артериальной бляшки и возможным ограничением или блокировкой кровотока. Современные методы лечения атеросклероза включают модификацию диеты и образа жизни (например, прекращение курения), фармацевтическое вмешательство (например, статины, антикоагулянты и т.д.) и хирургическое вмешательство (например, ангиопластика, стенты, шунтирование и т.д.). Непосредственная оценка эффективности фармацевтических вмешательств при развитии атеросклероза у людей является проблематичной из-за трудностей в точном выявлении и измерении бляшек и артериальных поражений у живых пациентов. Поэтому животные модели атеросклероза очень полезны для разработки и тестирования новых терапевтических методов лечения атеросклероза.

В данной области необходимы новые способы лечения, предотвращения или улучшения состояния при атеросклерозе.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к способам, применениям и композициям для лечения, предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента. Способ по настоящему изобретению включает введение пациенту одной или более доз ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3). Терапевтические способы по настоящему изобретению приводят к уменьшению образования атеросклеротических бляшек и атеросклеротических поражений у пациентов, нуждающихся в этом. Способы по настоящему изобретению также полезны для снижения общего холестерина в сыворотке, LDL холестерина и триглицеридов у пациента и для лечения заболеваний и расстройств, которые можно лечить путем снижения одного или более из общего холестерина, LDL холестерина и/или триглицеридов.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения у пациента до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3 диагностируют гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH) или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (HoFH) и/или повышенный липопротеин (a) (Lp[a]). Настоящее изобретение также включает в себя способы лечения, предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента, который имеет гиперхолестеринемию, которая не является семейной (т.е. не семейная гиперхолестеринемия). Пациенты, которые поддаются лечению способами по настоящему изобретению, в определенных вариантах осуществления включают тех пациентов, которые имеют или у которых диагностировали сердечно-сосудистое заболевание (например, атеросклеротическое сердечно-сосудистое заболевание). В некоторых вариантах осуществления пациентом, который поддается лечению способами по настоящему изобретению, является пациент, перенесший инсульт или инфаркт миокарда.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения ингибитор ANGPTL3 вводят пациенту в качестве дополнительной терапии к существующей липидонормализующей терапии пациента (например, на фоне статинотерапии пациента).

Типичные ингибиторы ANGPTL3, которые могут быть использованы в контексте способов по настоящему изобретению, включают, например, антитела против ANGPTL3, ингибиторы ANGPTL3 на основе нуклеиновой кислоты, низкомолекулярные ингибиторы ANGPTL3 и ANGPTL3-связывающие молекулы на структурной основе.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена блок-схема последовательности операций, иллюстрирующая процедуры, введения и измерения, выполненные на животных в течение всего исследования, описанного в примере 2 настоящего описания.

На фиг. 2А и 2В представлены уровни холестерина животных из разных групп обработки (обработки контролем, окрашенные квадраты, или обработки эвинакумабом, окрашенные круги [●]) в разные моменты времени на протяжении всего исследования, описанного в примере 2 в настоящем описании.

На фиг. 2А представлены средние уровни холестерина (мМ) в течение времени (в неделях).

На фиг. 2В представлено общее экспонирование холестерином (мМ × нед.) на 13 неделе.

На фиг. 3 представлены уровни триглицеридов (мМ) животных из разных групп обработки (обработки контролем, закрашенные квадраты [■], или обработки эвинакумабом, закрашенные круги [●]) в разные моменты времени на протяжении всего исследования, описанного в примере 2 настоящего описания.

На фиг. 4А-4С представлены липопротеиновые профили холестерина (мМ после отделения липопротеинов) животных из разных групп обработки (обработки контролем, закрашенные квадраты [■], или обработки эвинакумабом, закрашенные круги [●]) в разное время в течение всего исследования, описанного в примере 2 настоящего описания. Липопротеины разделяли на колонке с суперозой, и представленные значения являются абсолютными значениями на основе измерений холестерина в суммарной плазме на группу в различные указанные моменты времени.

На фиг. 4А представлены уровни холестерина из разных фракций плазмы, соответствующие времени = 0 исследования.

На фиг. 4В представлены уровни холестерина из разных фракций плазмы, соответствующие времени = 6 недель исследования.

На фиг. 4С представлены уровни холестерина из разных фракций плазмы, соответствующие времени = 13 недель исследования.

На фиг. 5А-5С представлены липопротеиновые профили триглицеридов (мМ после отделения липопротеинов) животных из разных групп обработки (обработки контролем, закрашенные квадраты [■], или обработки эвинакумабом, закрашенные круги [●]) в разное время в течение всего исследования, описанного в примере 2 настоящего описания. Липопротеины разделяли на колонке с суперозой, и представленные значения являлись абсолютными значениями на основе измерений триглицеридов в суммарной плазме на группу в различные указанные моменты времени.

На фиг. 5А представлены уровни триглицеридов из разных фракций плазмы, соответствующие времени = 0 исследования.

На фиг. 5В представлены уровни триглицеридов из разных фракций плазмы, соответствующих времени = 6 недель исследования.

На фиг. 5С представлены уровни триглицеридов из разных фракций плазмы, соответствующих времени = 13 недель исследования.

На фиг. 6А и 6В представлена площадь атеросклеротического поражения животных из различных групп обработки (группа обработки контролем, незакрашенный столбец или круги; или группа обработки эвинакумабом, закрашенный столбец или круги) на 13-й неделе исследования, описанного в примере 2 настоящего описания.

На фиг. 6А представлена средняя площадь атеросклеротического поражения на поперечный срез ($\times 1000 \text{ мкм}^2$) для различных групп обработки.

На фиг. 6В представлена диаграмма разброса общей площади поражения, демонстрирующая площадь атеросклеротического поражения на поперечный срез ($\times 1000 \text{ мкм}^2$) для отдельных животных в разных группах обработки.

На фиг. 7А и 7В представлено среднее некротическое содержание поперечных срезов из атеросклеротических поражений, классифицированных как тип IV или тип V, наблюдаемые у животных из разных групп обработки (группа обработки контролем, незакрашенный столбец, или группа обработки эвинакумабом закрашенный столбец) на неделе 13 исследования, описанного в примере 2 настоящего описания.

На фиг. 7А представлено абсолютное значение ($\text{мкм}^2 \times 1000$) некротической площади на поперечный срез.

На фиг. 7В представлены относительные значения (в процентах от площади поражения) некротического содержимого поражений.

Подробное описание

До того, как будет описано настоящее изобретение, следует понять, что это изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для их ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящем описании термин "примерно" при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем описании выражение "примерно 100" включает в себя 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые материалы и методы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем доку-

менте, могут быть использованы при практическом осуществлении настоящего изобретения, здесь будут описаны предпочтительные материалы и методы. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в описание посредством ссылки в полном объеме.

Способы предотвращения или ослабления атеросклероза

Настоящее изобретение в целом относится к способам и композициям для предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента. Способы по настоящему изобретению включают введение пациенту, нуждающемуся в этом, одной или более доз ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3). Согласно некоторым вариантам осуществления способы по настоящему изобретению приводят к уменьшению образования атеросклеротической бляшки у пациента. Например, способы по настоящему изобретению могут приводить к одному или более из снижения площади атеросклеротического поражения и/или снижения некротической площади атеросклеротических поражений у пациента.

Отбор пациентов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения пациенты, которые поддаются лечению способами по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, пациентов, которые имеют или у которых диагностирован атеросклероз, или которые подвержены риску развития атеросклероза. Соответственно, способы по настоящему изобретению включают в себя отбор пациента, имеющего атеросклероз или с риском развития атеросклероза, и введение пациенту одной или более доз ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3). Используемые в настоящем описании пациенты, которые "подвержены риску развития атеросклероза", включают пациентов, которые имеют или у которых проявляется один или более факторов риска развития атеросклероза. Факторы риска для атеросклероза хорошо известны в данной области и включают, без ограничения, повышенный уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL) в сыворотке, повышенный уровень триглицеридов в сыворотке (TG), пониженный уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) в сыворотке, гипертонию, сахарный диабет, семейный анамнез и курение сигарет. Способы оценки факторов риска атеросклероза для данного пациента также хорошо известны в данной области.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению способами по изобретению, является пациентом, у которого перед или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3 диагностировали гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH), гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (HoFH), повышенный липопротеин (a) (Lp[a]), аутомную доминантную гиперхолестеринемию (ADH, например ADH, связанную с одной или более мутациями с усилением функции в гене LDLR, гене ApoB и/или гене PCSK9), аутомно-рецессивную гиперхолестеринемию (ARH, например ARH, связанную с мутациями в LDLRAP1), а также случаи гиперхолестеринемии, которые отличаются от семейной гиперхолестеринемии (nonFH). Диагноз семейной гиперхолестеринемии (например, HeFH или HoFH) может быть получен путем генотипирования и/или клинических критериев. Для пациентов, которые не являются генотипированными, клинический диагноз может основываться либо на критериях Саймона Брума, либо на критериях для определенных FH, либо на критериях ВОЗ/голландской липидной сети с оценкой >8 баллов.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациентом, который поддается лечению способами по изобретению, является пациент, у которого диагностировали сердечно-сосудистое заболевание (CVD) до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3. Пациент также может быть выбран на основании истории коронарной болезни сердца (CHD). Используемый в настоящем описании термин "история CHD" (или "документированная история CHD") включает в себя один или более из (i) острого инфаркта миокарда (MI); (ii) скрытого MI; (iii) нестабильной стенокардии; (iv) процедуры реваскуляризации коронарных артерий (например, чрескожное коронарное вмешательство [PCI] или операция шунтирования коронарной артерии [CABG]) и/или (v) клинически значимой CHD, диагностированной инвазивным или неинвазивным тестированием (например, коронарная ангиография, стресс-тест с использованием беговой дорожки, стресс-эхокардиографии или ядерной визуализации).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению с помощью способов по изобретению, может быть выбран на основе наличия сердечно-сосудистых заболеваний, отличных от ишемической болезни сердца ("не-CHD-серечно-сосудистые заболевания"). Используемый в настоящем описании термин "не-CHD-CVD" включает в себя один или более из (i) документированного предшествующего ишемического инсульта с очаговым ишемическим неврологическим дефицитом, который сохраняется более 24 ч и, как считают, имеет атеротромботическое происхождение; (ii) заболевания периферических артерий; (iii) аневризмы брюшной аорты; (iv) стеноза атеросклеротической почечной артерии и/или (v) заболевания сонной артерии (транзиторные ишемические атаки или >50% обструкции сонной артерии).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению способами по изобретению, может быть выбран на основе наличия одного или нескольких дополнительных факторов риска, таких как, например, (i) документированное умеренное хроническое заболевание почек (CKD), как определено с помощью $30 \leq \text{eGFR} < 60$ мл/мин/1,73 м² в течение 3 месяцев или более; (ii) сахарный диабет типа 1 или типа 2 с поражением или без поражений органов-мишеней

(например, ретинопатия, нефропатия, микроальбуминурия) и/или (iii) рассчитанная 10-летняя оценка риска фатальных сердечно-сосудистых заболеваний $>5\%$ (рекомендации ESC/EAS для лечения дислипидемии, Conroy et al., 2003, Eur. Heart J. 24:987-1003).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению способами по изобретению, может быть выбран на основе наличия одного или нескольких дополнительных факторов риска, выбранных из группы, состоящей из возраста (например, старше 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 лет), расы, национального происхождения, пола (мужчина или женщина), физических привычек (например, регулярные занятия спортом, отсутствие занятий спортом), других ранее существовавших медицинских условий (например, диабет типа II, высокое кровяное давление и т.д.) и текущего статуса лекарственного средства (например, в настоящее время принимаются бета-блокаторы, ниацин, эзетимиб, фибраты, омега-3 жирные кислоты, секвестранты желчных кислот и т.д.).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению способами по изобретению, демонстрирует повышенный уровень одного или более воспалительных маркеров. Любой маркер системного воспаления может быть использован для целей настоящего изобретения. Подходящие воспалительные маркеры включают, без ограничения, С-реактивный белок, цитокины (например, IL-6, IL-8 и/или IL-17) и молекулы клеточной адгезии (например, ICAM-1, ICAM-3, BL-CAM, LFA-2, VCAM-1, NCAM и PECAM).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению способами по изобретению, может быть выбран на основе комбинации одного или более из вышеперечисленных критериев отбора или терапевтических характеристик. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент, подходящий для лечения способами по настоящему изобретению, может быть дополнительно выбран на основе наличия heFH или не-FH в сочетании с (i) документированной историей CHD, (ii) не-CHD-CVD и/или (iii) сахарным диабетом с поражением органов-мишеней; такие пациенты также могут быть выбраны на основе сывороточной концентрации LDL-C, превышающей или равной 70 мг/дл.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения пациент, который поддается лечению способами по изобретению, имеет гиперхолестеринемию, которая не контролируется адекватно суточной терапевтической схемой приема умеренных доз статинов, и может быть дополнительно выбран на основе наличия heFH, или не-FH без CHD, или не-CHD CVD, но имеющих либо (i) рассчитанную 10-летнюю оценку риска фатального CVD $\geq 5\%$; либо (ii) сахарный диабет без поражения органов-мишеней; такие пациенты также могут быть выбраны на основе сывороточной концентрации LDL-C, превышающей или равной 100 мг/дл.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациентом, который поддается лечению способами по изобретению, является пациент, который имеет семейный синдром хиломикронемии (FCS, также известный как дефицит липопротеин липазы).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения пациентом, который поддается лечению способами по изобретению, является пациент, который подвергается или недавно подвергся аферезу липопротеинов (например, в течение последних 6 месяцев, в течение последних 12 недель, в течение последних 8 недель, в течение последних 6 недель, в течение последних 4 недель, в течение последних 2 недель и т.д.).

Введение ингибитора ANGPTL3 в качестве дополнительной терапии.

Настоящее изобретение включает способы предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента, где пациенту вводят ингибитор ANGPTL3 в соответствии с конкретным количеством и частотой дозирования и где ингибитор ANGPTL3 вводят в качестве дополнения к ранее существовавшей липидонормализующей терапии пациента (LMT), как например дополнение к ранее существовавшей суточной терапевтической схеме статинов. (Конкретные примерные суточные терапевтические схемы статинов, к которым может быть добавлен ингибитор ANGPTL3, описаны в настоящем документе в другом месте).

Например, способы по настоящему изобретению включают в себя дополнительные терапевтические схемы, в которых ингибитор ANGPTL3 вводят в качестве дополнительной терапии к такой же стабильной суточной терапевтической схеме статинов (т.е. к такому же дозируемому количеству статина), которую пациент принимал до получения ингибитора ANGPTL3. В других вариантах осуществления ингибитор ANGPTL3 вводят в качестве дополнительной терапии к терапевтической схеме статинов, содержащей статин в количестве, которое больше или меньше, чем доза статина, на которой пациент находился до приема ингибитора ANGPTL3. Например, после запуска терапевтической схемы, включающей ингибитор ANGPTL3, вводимый с определенной частотой и количеством дозы, суточная доза статина, вводимая или назначенная пациенту, может (a) оставаться неизменной, (b) увеличиваться или (c) уменьшаться (например, с повышением дозы или с понижением дозы) по сравнению с суточной дозой статинов, которую пациент принимал перед началом терапевтической схемы приема ингибитора ANGPTL3 в зависимости от терапевтических потребностей пациента.

Терапевтическая эффективность.

Способы по настоящему изобретению приводят к уменьшению образования атеросклеротической бляшки в артериях пациента и/или к предотвращению прогрессирования атеросклероза у пациента. На-

пример, способы по настоящему изобретению полезны для ограничения или уменьшения площади атеросклеротического поражения и/или площади некротического ядра при атеросклеротических поражениях у пациента.

Способы по настоящему изобретению могут дополнительно приводить к снижению уровня в сыворотке одного или более липидных компонентов, выбранных из группы, состоящей из LDL-C, ApoB100, не-HDL-C, общего холестерина, VLDL-C, триглицеридов, Lp(a) и остаточного холестерина. Например, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения введение подходящему пациенту фармацевтической композиции, содержащей ингибитор ANGPTL3, приведет к среднему процентному снижению в сыворотке исходного уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) по меньшей мере примерно на 25%, 30, 40, 50, 60% или более; среднему процентному снижению ApoB100 по сравнению с исходным уровнем по меньшей мере примерно на 25, 30, 40, 50, 60% или более; среднему процентному снижению не-HDL-C по сравнению с исходным уровнем по меньшей мере примерно на 25, 30, 40, 50, 60% или более; среднему процентному снижению по сравнению с исходным уровнем общего холестерина по меньшей мере примерно на 10, 15, 20, 25, 30, 35% или более; среднему процентному снижению VLDL-C по сравнению с исходным уровнем по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25, 30% или более; среднему процентному снижению триглицеридов по сравнению с исходным уровнем по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35% или более и/или среднему процентному снижению Lp(a) по сравнению с исходным уровнем по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25% или более.

Ингибиторы ANGPTL3.

Способы по настоящему изобретению включают введение пациенту терапевтической композиции, содержащей ингибитор ANGPTL3. Используемый в настоящем описании термин "ингибитор ANGPTL3" представляет собой любой агент, который связывается с человеческим ANGPTL3 или взаимодействует с ним и ингибирует нормальную биологическую функцию ANGPTL3 *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры категорий ингибиторов ANGPTL3 включают низкомолекулярные антагонисты ANGPTL3, ингибиторы на основе нуклеиновой кислоты экспрессии или активности ANGPTL3 (например, кРНК или антисмысловые РНК), молекулы на основе пептидов, которые специфично взаимодействуют с ANGPTL3 (например, пептидное антитело), молекулы рецепторов, которые специфично взаимодействуют с ANGPTL3, ANGPTL3-связывающие структурные молекулы (например, DARPIn, белки с повтором HEAT, белки с повтором ARM, белки с повторами тетратрикопептидов, структурные конструкции на основе фибронектина и другими структурами на основе встречающихся в природе белков с повторами и т.д. [см., например, Voersma и Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857 и ссылки, приведенные там]) и аптамеры или их анти-ANGPTL3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы ANGPTL3, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, представляют собой антитела против ANGPTL3 или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфично связываются с человеческим ANGPTL3.

Используемый в настоящем описании термин "ангиопоэтин-подобный белок 3 человека", или "человеческий ANGPTL3", или "hANGPTL3" относится к ANGPTL3, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (см. также регистрационный номер NCBI NP_055310), или к его биологически активному фрагменту.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, содержащих четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также для обозначения их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются областями, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антитела против ANGPTL3 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным путем или искусственно. Консенсусная последовательность аминокислот может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в настоящем описании, включают любой природный, ферментативно доступный, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление,

или с использованием рекомбинантных методов генной инженерии, включающих манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей антитело и, необязательно, константные домены. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, вставки или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), такую как CDR3-пептид) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела с делетированными доменами, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-антитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", используемое в настоящем описании.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая примыкает или находится в рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, связанный с доменом VL, домены VH и VL могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный, по меньшей мере, с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут присутствовать в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3 и (xiv) VL-CL. В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из приведенных выше иллюстративных конфигураций, переменные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к получению гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами VH или VL (например, с помощью дисульфидной связи (связей)).

Как и в случае с полноразмерными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два различных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене. Любой формат мультиспецифичных антител, включая описанные в настоящем документе иллюстративные форматы биспецифичных антител, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием обычных методов, доступных в данной области.

Константная область антитела имеет важное значение в способности антитела фиксировать комплекс и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, желательно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

Используемый в настоящем описании термин "человеческое антитело" предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут, тем не менее, включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайтоспецифическим мутагеном *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в настоящем описании, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих,

таких как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Используемый в настоящем описании термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех человеческих антител, которые были получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяин (описанную ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описаны далее ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное животное для человеческих Ig-последовательностей, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, следовательно, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, будучи производными и связанными с последовательностями VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать естественным образом в репертуаре зародышевой линии человека *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью. Во второй форме димеры не связаны через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула примерно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полу-антитело). Эти формы чрезвычайно трудно разделить даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела, но не ограничивается этим. Единственная аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993), Molecular Immunology, 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в области шарнира, CH2 или CH3, которые могут быть желательными, например, при получении для улучшения выхода целевой формы антитела.

Используемый в настоящем описании термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено по меньшей мере из одного компонента его естественной среды. Для целей настоящего изобретения "выделенным антителом" является антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или ткани, или клетки, в которой антитело естественным образом существует или из которой естественным образом продуцируется. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное антитело может быть по существу свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "специфично связывается" или аналогичный означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно устойчив в физиологических условиях. Способы определения того, специфично ли антитело связывается с антигеном, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое "специфично связывается" с ANGPTL3, как используется в контексте настоящего изобретения, включает антитела, которые связываются с ANGPTL3 или с его частью с K_D менее чем примерно 1000 нМ, менее чем примерно 500 нМ, менее чем примерно 300 пМ, менее чем примерно 200 нМ, менее чем примерно 100 нМ, менее чем примерно 90 нМ, менее чем примерно 80 нМ, менее чем примерно 70 нМ, менее чем примерно 60 нМ, менее чем примерно 50 нМ, менее чем примерно 40 нМ, менее чем примерно 30 нМ, менее чем примерно 20 нМ, менее чем примерно 10 нМ, менее чем примерно 5 нМ, менее чем примерно 4 нМ, менее чем примерно 3 нМ, менее чем примерно 2 нМ, менее чем примерно 1 нМ или менее чем примерно 0,5 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфично связывается с человеческим ANGPTL3, обладает перекрестной реактивностью по отношению к другим антигенам, таким как молекулы ANGPTL3 из других видов (не человек).

Антитела против ANGPTL3, полезные для способов по настоящему изобретению, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко обнаружены путем сравнения представленных в настоящем описании аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных антител.

Настоящее изобретение включает способы, включающие использование антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных и/или CDR-областях подвергнуты мутации до соответствующего остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или до соответствующего остатка (остатков) другой последовательности зародышевой линии человека или до консервативной аминокислотной замены соответствующего зародышевого остатка (остатков) (такие изменения последовательности упомянуты в настоящем описании в совокупности как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники, начиная с описанных в настоящем документе последовательностей варибельной области тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все каркасные и/или CDR-остатки в доменах VH и/или VL подвергаются мутациям обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки подвергаются мутации обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных и/или CDR-остатков подвергаются мутации до соответствующего остатка (остатков) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательностью зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было изначально получено). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в рамках каркасных и/или CDR-областей, например, где определенные отдельные остатки подвергнуты мутации до соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или подвергаются мутации до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, улучшенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в случае наличия), уменьшенная иммуногенность и т.д. Использование антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных этим общим способом, включено в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает способы, включающие использование антител против ANGPTL3, содержащих варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем описании, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает использование антител против ANGPTL3, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, содержащие 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д., консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе.

Используемый в настоящем описании термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать взаимодействия в реальном времени путем обнаружения изменений концентрации белка в матрице биосенсора, например, с использованием системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences подразделение GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси).

Используемый в настоящем описании термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут обладать различными биологическими эффектами. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образуется путем пространственно близко расположенных аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп образуется смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать в себя фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело против ANGPTL3, используемое в способах по настоящему изобретению, представляет собой антитело с pH-зависимыми характеристиками связывания. Используемое в настоящем описании выражение "pH-зависимое связывание" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют "уменьшенное связывание с ANGPTL3 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" (для целей настоящего раскрытия оба выражения могут использоваться взаимозаменяемо). Например, антитела "с pH-зависимыми характеристиками связывания" включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с ANGPTL3 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH. В некоторых вариантах осуществ-

ления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с ANGPTL3 с аффинностью, которая является по меньшей мере в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, в 100 или более раз более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислом pH.

Согласно этому аспекту изобретения антитела против ANGPTL3 с pH-зависимыми характеристиками связывания могут обладать одной или более вариациями аминокислот относительно родительского антитела против ANGPTL3. Например, антитело против ANGPTL3 с pH-зависимыми характеристиками связывания может содержать одну или более замен или вставок гистидина, например, в одной или более CDR родительского антитела против ANGPTL3. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения предлагаются способы, включающие введение антитела против ANGPTL3, которое содержит аминокислотные последовательности CDR (например, CDR тяжелых и легких цепей), которые идентичны аминокислотным последовательностям CDR родительского антитела против ANGPTL3, за исключением замены гистидиновым остатком одной или более аминокислот одной или более CDR родительского антитела. Антитела против ANGPTL3 с pH-зависимым связыванием могут обладать, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более гистидиновыми заменами либо внутри одной CDR родительского антитела, либо распределены по множеству (например, 2, 3, 4, 5 или 6) CDR родительского антитела против ANGPTL3. Например, настоящее изобретение включает в себя использование антител против ANGPTL3 с pH-зависимым связыванием, содержащих одну или более замен гистидина в HCDR1, одну или более замен гистидина в HCDR2, одну или более замен гистидина в HCDR3, одну или более замен гистидина в LCDR1, одну или более замен гистидина в LCDR2 и/или одну или более замен гистидина в LCDR3 родительского антитела против ANGPTL3.

Используемый в настоящем описании термин "кислый pH" означает pH 6 или менее (например, менее чем примерно 6, менее чем примерно 5,5, менее чем примерно 5 и т.д.). Выражение "кислый pH" включает значения pH примерно 6, 5,95, 5,9, 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 или менее. Используемый в настоящем описании термин "нейтральный pH" означает pH примерно от 7 примерно до 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH примерно 7, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Неограничивающие примеры антител против ANGPTL3, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают, например, эвинакумаб, а также любые из иллюстративных антител против ANGPTL3, как указано в патенте США № 9018356 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), раскрытие которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме, или любые из иллюстративных антител против ANGPTL3, как указано в патенте США № 8742075 (Lexicon Pharmaceuticals, Inc.), описание которого включено посредством ссылки в полном объеме.

Получение человеческих антител.

Антитела против ANGPTL3 могут быть получены в соответствии с любым способом получения/выделения антител, известных в данной области. Например, антитела для использования в способах по настоящему изобретению могут быть получены с помощью гибридомных технологий, с помощью фагового дисплея, с помощью дрожжевого дисплея и т.д. Антитела для использования в способах по настоящему изобретению могут быть, например, химерными антителами, гуманизированными антителами или полностью человеческими антителами.

Способы генерации человеческих антител в трансгенных мышах известны в данной области. Любые такие известные способы могут быть использованы в контексте настоящего изобретения для создания человеческих антител, которые специфично связываются с ANGPTL3.

Например, используя технологию VELOCIMMUNE™ (см., например, US 6594541, Regeneron Pharmaceuticals) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, высокоаффинные химерные антитела к ANGPTL3 изначально выделяют с человеческой вариабельной областью и мышьиной константной областью. Технология VELOCIMMUNE® включает в себя генерацию трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий вариабельные области тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанные с эндогенными локусами константных областей, так что мышь продуцирует антитело, содержащее вариабельную область человека и константную область мыши в ответ на стимулирование антигеном. ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепей человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мыши VELOCIMMUNE® подвергают стимулированию интересующим антигеном и из крови мышей выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки), которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с клеточной линией миеломы для получения иммортализованных гибридомных клеточных линий, и такие гибридомные клеточные линии скринируют и отбирают для идентификации линий гибридомных клеток, которые продуцируют антитела, специфичные к интересующему антигену. ДНК, кодирующая вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепей, может быть выделена и связана с желательными изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть получен в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК,

кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Антитела характеризуются и отбираются по наличию желательных характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д., используя стандартные процедуры, известные специалистам в данной области. Константные области мыши заменяют целевой константной областью человека для получения полностью человеческого антитела по изобретению, например, дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного использования, в переменной области находятся высокоаффинные антигенсвязывающие и целевые характеристики специфичности.

В общем, антитела, которые могут быть использованы в способах по настоящему изобретению, обладают высокой аффинностью, как описано выше, при измерении путем связывания с антигеном, либо иммобилизованного на твердой фазе, либо в растворе. Константные области мыши заменяются требуемыми константными областями человека для генерирования полностью человеческих антител по изобретению. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного использования, в переменной области находятся высокоаффинные антигенсвязывающие и целевые характеристики направленной специфичности.

Конкретные примеры человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, которые специфично связываются с ANGPTL3, которые могут быть использованы в контексте способов по настоящему изобретению, включают антитела или антигенсвязывающие белки, содержащие шесть CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из пары аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), содержащих SEQ ID NO: 2/3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который может быть использован в способах по настоящему изобретению, содержит области, определяющие комплементарность тяжелых и легких цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, который может быть использован в способах по настоящему изобретению, содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Фармацевтические композиции и способы введения.

Настоящее изобретение включает способы, которые включают введение ингибитора ANGPTL3 пациенту, где ингибитор ANGPTL3 содержится в фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции по изобретению приготовлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают подходящую передачу, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липидосодержащие (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311.

Известны различные системы доставки, и они могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по изобретению, например инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожные, внутримышечные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композицию можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, ректальную и кишечную слизистую оболочку и т.д.) и вместе с другими биологически активными агентами.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с использованием стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки устройство для доставки в форме ручки легко может иметь приложения для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такое устройство для доставки в форме ручки может быть многоразовым или одноразовым. Многоразовое устройство доставки в форме ручки обычно использует сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции, которая была внутри картриджа, и после того, как картридж становится пустым, пустой картридж можно легко отбросить и заменить на новый, который будет содержать фармацевтическую композицию. Затем устройство для доставки в форме ручки может быть повторно использовано. В одноразовом устройстве для доставки в форме ручки нет сменного картриджа. Наоборот, одно-

разовое устройство для доставки в форме ручки заполняется фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. После того, как резервуар опустеет благодаря использованию всей фармацевтической композиции, все устройство отбрасывается.

Многочисленные многоразовые устройства для доставки в форме ручки и автоинжекторы имеют приложения для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), ручка DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Швейцария), ручка HUMALOG MIX 75/25™, ручка HUMALOG™, HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), ручка BD™ (Becton Dickinson, Франклин-лейке, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств доставки в форме ручки, имеющих приложения для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, Калифорния), PENLETT™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park Иллинойс), и это лишь немногие из них.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может доставляться в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может использоваться помпа (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления могут быть использованы полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Еще в одном варианте осуществления система контролируемого высвобождения может быть расположена вблизи мишени композиции, поэтому требуется лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, p. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены известными способами. Например, инъекционные препараты могут быть получены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые могут быть использованы в комбинации с подходящим солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол) (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрированного касторового масла) и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут использоваться в комбинации с солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в лекарственных формах в стандартной дозе, подходящей для соответствия дозам активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д.

Дозировка.

Количество ингибитора ANGPTL3 (например, антитело против ANGPTL3), вводимое пациенту в соответствии со способами по настоящему изобретению, обычно представляет собой терапевтически эффективное количество. Используемый в настоящем описании термин "терапевтически эффективное количество" означает дозу ингибитора ANGPTL3, которая приводит к детектируемому снижению (по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75% или более от исходного значения) одного или более параметров, выбранных из группы, состоящей из LDL-C, ApoB100, не-HDL-C, общего холестерина, VLDL-C, триглицеридов, Lp(a) и остаточного холестерина, или количество, которое предотвращает или ослабляет атеросклероз у пациента (как описано далее в настоящем документе).

В случае антитела против ANGPTL3 терапевтически эффективное количество может составлять примерно от 0,05 примерно до 600 мг, например, примерно 0,05 мг, примерно 0,1 мг, примерно 1 мг, примерно 1,5 мг, примерно 2 мг, примерно 10 мг, примерно 20 мг, примерно 30 мг, примерно 40 мг, примерно 50 мг, примерно 60 мг, примерно 70 мг, примерно 80 мг, примерно 90 мг, примерно 100 мг, примерно 110 мг, примерно 120 мг, примерно 130 мг, примерно 140 мг, примерно 160 мг, примерно 170 мг, примерно 180 мг, примерно 190 мг, примерно 200 мг, примерно 210 мг, примерно 220 мг, примерно 230 мг, примерно 240 мг, примерно 250 мг,

примерно 260 мг, примерно 270 мг, примерно 280 мг, примерно 290 мг, примерно 300 мг, примерно 310 мг, примерно 320 мг, примерно 330 мг, примерно 340 мг, примерно 350 мг, примерно 360 мг, примерно 370 мг, примерно 380 мг, примерно 390 мг, примерно 400 мг, примерно 410 мг, примерно 420 мг, примерно 430 мг, примерно 440 мг, примерно 450 мг, примерно 460 мг, примерно 470 мг, примерно 480 мг, примерно 490 мг, примерно 500 мг, примерно 510 мг, примерно 520 мг, примерно 530 мг, примерно 540 мг, примерно 550 мг, примерно 560 мг, примерно 570 мг, примерно 580 мг, примерно 590 мг или примерно 600 мг антитела против ANGPTL3. Другие количества дозы ингибиторов ANGPTL3 будут очевидны для специалистов в данной области техники и рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Количество антитела против ANGPTL3, содержащееся в отдельных дозах, может быть выражено в миллиграммах антител на 1 кг массы тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антитело против ANGPTL3 можно вводить пациенту в дозе примерно от 0,0001 примерно до 10 мг/кг массы тела пациента.

Комбинированные терапии.

Как описано далее в настоящем документе, способы по настоящему изобретению могут включать введение ингибитора ANGPTL3 пациенту в комбинации ("на фоне") с ранее назначенной пациенту терапии, снижающей уровень липидов. Например, в контексте предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента может быть введен ингибитор ANGPTL3 в комбинации со стабильной ежедневной терапевтической схемой введения статинов. Примерные ежедневные терапевтические схемы введения статинов, с которыми в комбинации может вводиться ингибитор ANGPTL3 в контексте настоящего изобретения, включают, например, аторвастатин (10, 20, 40 или 80 мг ежедневно) (аторвастатин/эзетимиб 10/10 или 40/10 мг ежедневно), росувастатин (5, 10 или 20 мг ежедневно), церивастатин (0,4 или 0,8 мг ежедневно), питевастатин (1, 2 или 4 мг в день), флувастатин (20, 40 или 80 мг ежедневно), симвастатин (5, 10, 20, 40 или 80 мг ежедневно), симвастатин/эзетимиб (10/10, 20/10, 40/10 или 80/10 мг ежедневно), ловастатин (10, 20, 40 или 80 мг ежедневно), правастатин (10, 20, 40 или 80 мг ежедневно) и их комбинации. Другие терапии для снижения уровня липидов, в комбинации с которыми можно вводить ингибитор ANGPTL3 в контексте настоящего изобретения, включают, например, (1) агент, который ингибирует поглощение холестерина и/или повторное поглощение желчных кислот (например, эзетимиб); (2) агент, который увеличивает катаболизм липопротеина (такой как ниацин); и/или (3) активаторы транскрипционного фактора LXR, который играет роль в элиминации холестерина, такие как 22-гидроксихолестерин.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение включает способы предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента путем введения пациенту ингибитора ANGPTL3 в комбинации с ингибитором ANGPTL4 (например, антитело против ANGPTL4 или его антигенсвязывающий фрагмент), ингибитором ANGPTL8 (например, антитело против ANGPTL8 или его антигенсвязывающий фрагмент) и/или ингибитором PCSK9 (например, антитело против PCSK9 или его антигенсвязывающий фрагмент). Неограничивающие примеры антител против PCSK9, которые могут быть использованы в контексте настоящего изобретения, включают, например, алирокумаб, эволюкумаб, бокоцизумаб, лоделцизумаб, ралпанцизумаб или антигенсвязывающие части любого из вышеуказанных антител.

Схемы введения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения множество доз ингибитора ANGPTL3 (т.е. фармацевтической композиции, содержащей ингибитор ANGPTL3) может вводиться пациенту в течение определенного времени (например, на фоне ежедневной терапевтической схемы введения статинов или другой фоновой терапии, снижающей уровень липидов). Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение пациенту нескольких доз ингибитора ANGPTL3. Используемый в настоящем описании термин "последовательное введение" означает, что каждая доза ингибитора ANGPTL3 вводится пациенту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают в себя последовательное введение пациенту единственной начальной дозы ингибитора ANGPTL3, за которой следует одна или более вторичных доз ингибитора ANGPTL3 и, необязательно, за которой следует одна или более третичных доз ингибитора ANGPTL3.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения индивидуальных доз фармацевтической композиции, содержащей ингибитор ANGPTL3. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале схемы лечения (также называемая "базовой дозой"); "вторичные дозы" - дозы, вводимые после начальной дозы; а "третичные дозы" - дозы, вводимые после вторичных доз. Начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество ингибитора ANGPTL3, но обычно могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество ингибитора ANGPTL3, содержащегося в начальных, вторичных и/или третичных дозах, варьируется по отношению друг к другу (например, корректируется вверх или вниз по мере необходимости) в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в качестве "ударных доз" с последующими дозами, которые вводятся менее часто (на-

пример, "поддерживающие дозы").

Согласно примерным вариантам 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, 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 непосредственно после предшествующей дозы. Выражение "непосредственно предшествующая доза", используемое в настоящем описании, означает в последовательности множества введений дозу антигенсвязывающей молекулы, которая вводится пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз ингибитора ANGPTL3. Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводится только одна вторичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждая вторичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2, 4, 6, 8 или более недель после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множество третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 1-2, 4, 6, 8 или более недель после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может изменяться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться в ходе лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Примеры

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание способов осуществления и применения способов и композиций по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы рассматривают как их изобретение. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых числовых значений (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление соответствует атмосферному или около того.

Пример 1. Получение человеческих антител к человеческому ANGPTL3.

Антитела против ANGPTL3 человека были получены, как описано в патенте США № 9018356. Иллюстративный ингибитор ANGPTL3, используемый в следующем примере, представляет собой человеческое антитело против ANGPTL3, обозначенное как "H4H1276S", также известное как "эвинакумаб". Эвинакумаб имеет следующие характеристики аминокислотной последовательности:

тяжелая цепь, содержащая SEQ ID NO: 10, и легкая цепь, содержащая SEQ ID NO: 11;
 вариабельная область тяжелой цепи (HCVR), содержащая SEQ ID NO: 2, и вариабельный домен легкой цепи (LCVR), содержащий SEQ ID NO: 3;
 HCDR1, область 1, определяющая комплементарность тяжелой цепи, содержащая SEQ ID NO: 4, HCDR2, содержащая SEQ ID NO: 5, HCDR3, содержащая SEQ ID NO: 6;
 LCDR1, область 1, определяющая комплементарность легкой цепи, содержащая SEQ ID NO: 7, LCDR2, содержащая SEQ ID NO: 8, и LCDR3, содержащая SEQ ID NO: 9.

Пример 2. Антитело против ANGPTL3 предотвращает развитие атеросклероза в мышинной модели.

Введение.

Целью настоящего исследования было оценить влияние ингибирования ANGPTL3 на развитие атеросклероза у мышей APOE*3Leiden.CETP, хорошо зарекомендовавшей себя модели гиперлипидемии со всеми признаками смешанной или семейной дис-бета-липопротеинемии и атеросклероза. (См., например, Kühnast et al., 2014, J. Lipid Res. 55:2103-2112, для общего описания мышинной модели APOE*3Leiden.CETP (альтернативно обозначаемой в настоящем описании "мышь E3L.CETP") и ее использования для оценки влияния фармакологического агента на развитие атеросклероза).

Ингибирование ANGPTL3 достигали с использованием антитела против ANGPTL3. Конкретное антитело против ANGPTL3, используемое в этих исследованиях, представляет собой антитело, называемое эвинакумабом, как описано выше. Контрольное антитело, используемое в этих исследованиях, представляет собой антитело того же изотипа к нерелевантной мишени.

Дизайн эксперимента.

Иллюстрация схемы исследования показана на фиг. 1. Эвинакумаб представляет собой полностью человеческое антитело IgG4. Таким образом, при отборе в разных штаммах мыши у некоторых мышей нарабатываются антилекарственные антитела, которые исключают эффективность терапевтического средства. Процент мышей, нарабатывающих этот ответ против лекарственных средств, может быть разным для каждой модели мыши/генетического фона. По этой причине большее количество мышей в

группе было включено в это первое исследование на мышах APOE*3Leiden.CETP, чтобы определить, у скольких мышей развивается иммунный ответ против белков человека в этой конкретной модели. После исключения мышей, развивающих иммунный ответ против белков человека, оставшиеся мыши могут быть использованы для оценки влияния эвинакумаба на атеросклероз.

63 самки мышей APOE*3Leiden.CETP сажали на диету Т (полусинтетическая модифицированная диета, описанная Nishina et al. 1990, J. Lipid Res. 31:859, с добавлением 0,15% холестерина и 15% какао-масла. После 4-недельного периода введения из исследования удаляли 13 мышей с низким уровнем ответа, а оставшихся 50 мышей подразделяли на одну группу контроля из 20 мышей и одну группу обработки эвинакумабом из 30 мышей, соответствующих по массе тела, уровню холестерина в плазме и триглицеридов после 4 ч голодания ($t=0$).

Обработку эвинакумабом или контрольным антителом проводили еженедельно посредством подкожных инъекций в дозе 25 мг/кг/неделя. Объем инъекции в течение периода обработки составлял 10 мл/кг с использованием 0,9% NaCl в качестве носителя и регулировался до последнего измеренного значения массы тела. Массу тела и потребление пищи (на клетку) измеряли на неделе 0, 3, 6, 8, 11 и 13.

Через 0, 2, 4, 6, 8, 11 и 13 недель обработки проводили забор образцов крови после 4 ч голодания. Уровень холестерина и триглицеридов в плазме измеряли индивидуально и собирали дополнительную ЭДТА-плазму для оценки hFc и мышинных антител против человеческих белков. Через 6 недель обработки оценивали первый антилекарственный ответ и из исследования удаляли 3 мышей группы контроля и 5 мышей группы обработки с высоким уровнем антител против лекарственных средств.

Липопротеиновые профили измеряли на неделе 0, 6 и 13 в образцах плазмы, суммированных на группу. Кал собирали в каждой клетке в течение недели 12 (дважды в течение 48 ч). В момент времени $t=13$ мышей умерщвляли без голодания. ЭДТА-плазму получали путем пункции сердца и собирали несколько тканей. Развитие атеросклероза в корне аорты измеряли у 15 мышей на группу (после исключения мышей, у которых развивался антилекарственный ответ) путем измерения количества поражения, площади поражения и тяжести поражения. Кроме того, определяли состав поражения.

- (1) График измерений параметров выглядит следующим образом:
- (2) масса тела (неделя 0, 3, 6, 8, 11 и 13);
- (3) потребление пищи (на клетку, неделя 0, 3, 6, 8, 11 и 13);
- (4) общий холестерин и триглицериды в плазме (после 4 ч голодания на неделе 0, 2, 4, 6, 8, 11 и 13);
- (5) сбор 20 мкл ЭДТА-плазмы для оценки hFc и мышинных антител против белков человека (после 4 ч голодания на неделе 0, 2, 4, 6, 8, 11 и 13);
- (6) липопротеиновые профили (холестерин и триглицериды, суммированные на группу, на неделе 0, 6 и 13);
- (7) развитие атеросклероза в корне аорты (15 мышей на группу): (а) количество поражения, (б) общая площадь поражения, (с) тяжесть поражения, (д) состав поражения (например, макрофаг, гладкомышечная клетка в "колпачке", некроз и содержание коллагена) и (е) слипание моноцитов. (При умерщвлении [неделя 13] аорты собирали у всех мышей, однако анализ атеросклероза проводили с 15 мышами на группу, отбирали мышей, у которых не вырабатывались антилекарственные антитела).

Методы.

Измерение массы тела и потребления пищи проводили в соответствии со стандартными процедурами.

Образцы плазмы крови получали в соответствии со стандартными процедурами. Общий уровень холестерина и триглицеридов в плазме определяли с использованием коммерчески доступных наборов.

Измерение липопротеиновых профилей проводили с помощью анализа FPLC с использованием аппарата АКТА от Amersham Biosciences. Анализ проводили на суммарных образцах для группы. Холестерин и триглицериды измеряли во фракциях с использованием коммерчески доступных наборов.

Площадь атеросклеротического поражения и тяжесть оценивали в области корня аорты, как сообщалось ранее (см., например, Kühnast et al., 2012, J. Hypertens, 30:107-116). Корень аорты идентифицировали появлением листочков аортального клапана, а последовательные поперечные срезы всей области корня аорты (толщиной 5 мкм с интервалами 50 мкм) были заключены на покрытых 3-аминопропилтриэтоксисиланом стеклах и окрашены с помощью гематоксилина-флюксина-шафрана (HPS). Для каждой мыши площадь поражения измеряли в 4 последовательных срезах. Каждый срез состоит из трех сегментов (разделенных клапанами). Для определения размера и тяжести атеросклеротических поражений их классифицировали на пять категорий в соответствии с Американской кардиологической ассоциацией (АНА) (см. Stary et al., 1995, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 15:1512-1531):

- тип 1: ранние жировые полоски (до 10 пенистых клеток в интима без каких-либо изменений);
- тип 2: регулярные жировые полоски (десять или более пенистых клеток в интима без каких-либо других изменений);
- тип 3: мягкая бляшка (пенистые клетки с фиброзным колпачком);
- тип 4: умеренная бляшка (более прогрессивные поражения с затронутой средой, но без потери архитектуры среды);
- тип 5: тяжелая бляшка (среда сильно повреждена, часто наблюдаются сломанные эластичные во-

локна, щели холестерина, кальцификация и некроз).

Изображения делали с помощью микроскопа Olympus BX51, а площади измеряли с помощью программного обеспечения для обработки изображений. Общая площадь поражения и количество поражений были рассчитаны для каждого поперечного среза. Здоровые сегменты рассчитывались как процент от общего количества сегментов. Также определяли тяжесть поражения в процентах от общего количества поражений. Поражения типа I-III классифицировали как умеренные поражения, а поражения типа IV-V классифицировали как тяжелые поражения.

Количество моноцитов, прилипающих к активированному эндотелию, подсчитывали в каждом сегменте, используемом для количественной оценки поражения, после иммуноокрашивания с помощью антисыворотки AIA 31240 (1:1000, Accurate Chemical and Scientific, New York, New York, USA), и расчет проводили на поперечный срез.

Макрофагальную площадь поражений измеряли после иммуноокрашивания с помощью антитела против мышиноного Mac-3 (1:50, BD Pharmingen, Нидерланды). Окрашивание с помощью Sirius Red выполняли для окрашивания коллагена. Площадь гладкомышечных клеток фиброзного колпачка измеряли после иммуноокрашивания антителом к гладкомышечному альфа-актину (1:400, PROGEN Biotechnik GmbH, Гейдельберг, Германия), который перекрестно реактивен с мышинным альфа-актином. Фотографии/изображения делали с помощью микроскопа Olympus BX51. Макрофагальную, коллагеновую, площадь некротического ядра и площадь гладкомышечных клеток определяли количественно с помощью программного обеспечения для обработки изображений. Содержание макрофагов, гладкомышечных клеток (SMC), некротического ядра и коллагена в очагах поражений рассчитывали в виде процента от площади поражения. Индекс чувствительности/стабильности бляшки рассчитывали путем деления суммы факторов стабилизации SMC и коллагена на сумму факторов дестабилизации макрофагов и некротического ядра.

На 13-й неделе мышей умерщвляли без голодания с помощью CO₂. Не назначали никакой последней инъекции антител в течение 13 недель перед умерщвлением. После умерщвления собирали как можно больше EDTA-плазмы (через пункцию сердца) и хранили при -70°C до дальнейшего использования. Сердца, включая корень аорты, фиксировали в 10% формалине. Торакальную аорту собирали и фиксировали в 10% формалине.

Статистика.

В зависимости от нормальности значимость различий между группами рассчитывали непараметрически, используя компьютерную программу SPSS и U-тест Манна-Уитни для независимых образцов. Значение $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

Статистические различия в группе обработки по сравнению с группой контроля обозначены на чертежах звездочкой в моменты измерений.

Результаты.

Масса тела.

Результаты по массе тела суммированы в табл. 1. Значения представляют собой абсолютные значения (граммы) и представляют собой средние значения $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 1

Масса тела (г)							
	Время (недели)	t=0	t=3	t=6	t=8	t=11	t=13
Контрольное антитело (AB)	AVG	21,8	21,6	22,1	22,7	23,6	23,4
	SD	1,4	1,2	1,3	1,4	1,7	2,0
Эвинакумаб	AVG	21,3	21,6	21,8	22,2	23,1	23,0
	SD	1,4	1,5	1,4	1,3	1,5	1,7

Масса тела: Р-величина	t=0	t=3	t=6	t=8	t=11	t=13
Контроль по сравнению с эвинакумаб	0,400	0,747	0,425	0,477	0,715	0,847

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Не было различий в массе тела между группой, получавшей эвинакумаб, и группой контроля.

Прием пищи.

Результаты по приему пищи суммированы в табл. 2. Значения представляют собой абсолютные значения (г/мышь/день) и представляют собой средние значения $\pm$ SD для 17 клеток (все мыши, перед сопоставлением) или для 4-6 клеток (после сопоставления и начала обработки).

Таблица 2

Потребление пищи (г/м/д)		t=0	t=3	t=6	T=8	t=11	t=13
Время (недели)	АВ	2,9	2,6	2,4	2,3	2,6	2,5
	SD	0,2	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4
Эвинакумаб	АВ	2,9	2,7	2,4	2,3	2,5	2,5
	SD	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4

Прием пищи: Р-величина	t=0	t=3	t=6	T=8	t=11	t=13
Контроль по сравнению с эвинакумаб	n/a	0,476	0,914	0,914	0,914	1,000

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Не было различий в потреблении пищи для группы, получавшей эвинакумаб, и группы контроля. Холестерин в плазме.

Результаты по уровню холестерина в плазме суммированы в табл. 3 и 4 и на фиг. 2А и 2В. Значения представляют собой абсолютные значения (мМ) и представляют собой средние значения $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 3

Холестерин (мМ)		t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Время (недели)	АВ	24,1	29,9	28,0	26,7	27,6	22,1	20,9
	SD	3,1	5,0	4,5	3,3	4,5	5,4	4,6
Эвинакумаб	АВ	23,7	12,6	14,0	14,1	13,6	10,8	9,6
	SD	2,4	2,4	1,9	2,2	2,5	1,7	2,1

Холестерин: Р-величина	t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Контроль по сравнению с эвинакумаб	0,9,14	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Таблица 4

Холестерин (мМ)		Воздействие на общий Холестерин (мМ*нед)
Время (недели)	АВ	t=13
	SD	393,5
Эвинакумаб	АВ	49,7
	SD	230,2
Воздействие на Холестерин: Р-величина		t=13
Контроль по сравнению с эвинакумаб		<0,001

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом приводила к значительному снижению холестерина в плазме по сравнению с группой контроля во все моменты времени (среднее снижение на 52%). В конце эксперимента воздействие холестерина во время эксперимента (0-13 недель + вступительный период) значительно снижалось при обработке эвинакумабом (41%, $p < 0,001$) по сравнению с группой контроля.

Триглицериды в плазме.

Результаты по уровню триглицеридов плазмы суммированы в табл. 5 и на фиг. 3. Значения представляют собой абсолютные значения (мМ) и представляют собой средние значения $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 5

Триглицериды (мм)								
Время (недели)		t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Контрольное АВ	AVG	7,5	5,5	4,9	4,8	3,6	4,0	3,4
	SD	2,6	1,3	1,6	1,5	1,3	1,0	1,2
Эвинакумаб	AVG	7,4	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6
	SD	2,0	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2

Триглицериды : Р-величина	t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Контроль по сравнению с эвинакумаб	0,747	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом приводила к значительному снижению триглицеридов в плазме по сравнению с группой контроля во все моменты времени (среднее снижение на 84%).

Профили липопротеина.

Липопротеины разделяли на колонке суперозы. Фракции холестерина и триглицеридов при t=0, 6 и 13 недель показаны на фиг. 4А-4С [холестерин] и 5А-5С [триглицериды]. Значения представляют собой абсолютные значения из измерений холестерина и триглицеридов в суммированной плазме на группу при t=0, 6 и 13 недель. Для целей этого анализа фракции 3-7 рассматривались как VLDL; 8-16 как IDL/LDL и 17-24 как HDL.

При t=0 до начала обработок не наблюдалось различий в профилях липопротеинов, а после 6 и 13 недель обработки эвинакумабом уровень холестерина в плазме, измеренный в образцах, суммированных на группу, уменьшался в пике VLDL-LDL по сравнению с группой контроля и, по-видимому, увеличивался в пике HDL (см. фиг. 4В и 4С). Профили триглицеридов продемонстрировали аналогичную картину (см. фиг. 5А-5С).

Эти данные согласуются с наблюдаемым снижением общего уровня холестерина и уровня триглицеридов у индивидуальных животных во время исследования.

Площадь атеросклеротического поражения.

Данные по площади атеросклеротического поражения суммированы в табл. 6 и на фиг. 6А и 6В. Значения представляют собой абсолютные значения площади поражения в корне аорты на поперечный срез и выражаются как среднее значение $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 6

Площадь поражения на поперечный срез (*1000 мкм ²)		
Время (недели)		t=13
Контрольное АВ	AVG	216,1
	SD	49,3
Эвинакумаб	AVG	133,0
	SD	52,8

Площадь поражения: Р-величина	t=13
Контроль по сравнению с эвинакумаб	

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Общая площадь поражения в корне аорты группы контроля составила 216082 мкм² на поперечный срез при умерщвлении в момент времени t=13 недель. Обработка эвинакумабом значительно уменьшала общую площадь поражения на 39% (p<0,001) по сравнению с группой контроля, как обнаружено при умерщвлении.

Атеросклероз: количество поражений.

Количество атеросклеротических поражений на поперечный срез суммировано в табл. 7. Значения представляют собой абсолютные значения (количество поражений) и выражаются в виде средних значений $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 7

Количество поражений на поперечный срез (*1000 мкм ²)		
	Время (недели)	t=13
Контрольное АВ	AVG	5,0
	SD	0,8
Эвинакумаб	AVG	5,0
	SD	1,1
Количество поражений: P-величина		
Контроль по сравнению с эвинакумаб		0,880

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Не было различий в количестве поражений между группой, получавшей эвинакумаб, и группой контроля.

Атеросклероз: тяжесть поражений.

Результаты относительно тяжести атеросклеротических поражений суммированы в табл. 8. Значения представляют собой проценты от общего количества поражений и выражаются в виде средних значений $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 8

Тяжесть поражений (%)			
	Время (недели)	Умеренные поражения (Тип I-III)	Тяжелые поражения (Тип IV-V)
Контрольное АВ	AVG	27,7	72,3
	SD	10,6	10,6
Эвинакумаб	AVG	36,8	63,2
	SD	26,8	26,8
Тяжесть поражений: P-величина			
Контроль по сравнению с эвинакумаб		0,451	0,451

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Не было различий в тяжести поражения между группой, получавшей эвинакумаб, и группой контроля.

Атеросклероз: здоровые сегменты.

Количество здоровых атеросклеротических сегментов суммировано в табл. 9. Значения представляют собой процент неатеросклеротических ("здоровых") сегментов. Значения представляют собой средние значения $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 9

Здоровые сегменты (%)		
	Время (недели)	t=13
Контрольное АВ	AVG	2,4
	SD	8,9
Эвинакумаб	AVG	2,8
	SD	8,7
Здоровые сегменты: P-величина		
Контроль по сравнению с эвинакумаб		0,813

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Не было различий в количестве здоровых сегментов между группой, получавшей эвинакумаб, и группой контроля.

Атеросклероз: содержание макрофагов.

Содержание макрофагов в поражениях суммировано в табл. 10 и на фиг. 7А. Значения представляют собой абсолютные значения (мкм² $\times$ 1000) или относительные значения (% поражения) и выражаются в виде средних значений $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 10

		Площадь макрофагов/поперечный срез (мкм ² *1000)		Содержание макрофагов (% поражения)	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контрольное	AVG	25,9	22,7	12,9	12,1
AB	SD	8,3	8,3	4,7	4,9
Эвинакумаб	AVG	19,3	15,9	17,2	14,6
	SD	9,7	10,6	7,7	5,6

Площадь с макрофагами: P-величина		Площадь с макрофагами/поперечный срез (мкм ² *1000)		Содержание макрофагов (% поражения)	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контроль по сравнению с		0,070	0,070	0,102	0,227

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом, как правило, уменьшала содержание макрофагов на поперечный срез в атеросклеротических поражениях типа IV-V по сравнению с группой контроля. Однако этой разницы не наблюдали после коррекции общей площади поражения, которая выражалась в процентах макрофагов при поражениях типа IV-V (фиг. 7A).

Атеросклероз: некротическое содержание.

Некротическое содержание поражений суммировано в табл. 11 и на фиг. 7A. Значения представляют собой абсолютные значения (мкм² × 1000) или относительные значения (% поражения) и выражаются в виде средних значений ± SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 11

		Некротическая область/поперечный срез (мкм ² *1000)		Некротическое содержание (% поражения)	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контрольное	AVG	19,4	18,8	8,8	9,0
AB	SD	10,2	10,2	3,4	3,6
Эвинакумаб	AVG	6,0	5,8	4,5	4,9
	SD	3,8	3,9	2,0	1,8

Некротическая область: P-величина		Некротическая область/поперечный срез (мкм ² *1000)		Некротическое содержание (% поражения)	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контроль по сравнению с эвинакумаб		<0,001	<0,001	<0,001	0,001

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом значительно уменьшала некротическое содержание в поперечном срезе в атеросклеротических поражениях типа IV-V по сравнению с группой контроля (на 69%, p<0,001). После коррекции общей площади поражения процентная доля площади некротизированной ткани в поражениях типа IV-V также значительно снижалась по сравнению с группой контроля (на 45%, p=0,001) (фиг. 7A).

Атеросклероз: гладкомышечные клетки в фиброзном колпачке.

Данные по количественной оценке гладкомышечных клеток (SMC) в фиброзном колпачке поражений суммированы в табл. 12 и на фиг. 7B. Значения представляют собой абсолютные значения (мкм² × 1000) или относительные значения (% поражения) и выражаются в виде средних значений ± SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 12

		SMC площадь/поперечный срез (мкм ² *1000)		SMC (%) поражения	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контрольное AB	AVG	24,9	23,4	12,1	12,1
	SD	7,7	7,7	3,2	3,3
Эвинакумаб	AVG	15,8	14,4	13,5	13,7
	SD	7,5	8,0	4,2	4,6

SMC площадь: Р- величина		SMC площадь/поперечный срез (мкм ² *1000)		SMC содержание (%) поражения	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контроль по сравнению с эвинакумаб					
		0,005	0,009	0,217	0,210

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом значительно уменьшала площадь гладкомышечных клеток (SMC) на поперечный срез при атеросклеротических поражениях типа IV-V по сравнению с группой контроля (на 39%, $p=0,009$). Однако после коррекции общего поражения процент SMC в фиброзном колпачке при поражениях типа IV-V не уменьшался значительно по сравнению с группой контроля (фиг. 7B).

Атеросклероз: содержание коллагена

Содержание коллагена в поражениях суммировано в табл. 13 и на фиг. 7B. Значения представляют собой абсолютные значения (мкм² × 1000) или относительные значения (% поражения) и выражаются в виде средних значений ± SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 13

		Площадь коллагена/поперечный срез (мкм ² *1000)		Содержание коллагена (%) поражения	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контрольное AB	AVG	102,6	96,9	48,7	48,5
	SD	34,0	34,7	8,7	9,2
Эвинакумаб	AVG	62,0	58,1	48,7	52,3
	SD	29,2	30,5	10,3	8,2

Площадь коллагена: Р- величина		Площадь коллагена/ поперечный срез (мкм ² *1000)		Содержание коллагена (%) поражения	
		Тип III-V	Тип IV-V	Тип III-V	Тип IV-V
Контроль по сравнению с эвинакумаб					
		0,005	0,009	0,813	0,227

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом значительно уменьшала содержание коллагена в поперечном срезе при атеросклеротических поражениях типа IV-V по сравнению с группой контроля (на 40%, $p=0,009$). Однако после коррекции общей площади поражения процентное содержание коллагена в поражениях типа IV-V значительно не уменьшалось по сравнению с группой контроля (фиг. 7B).

Атеросклероз: адгезия моноцитов.

Процент моноцитов на поперечный срез суммирован в табл. 14. Значения представляют собой абсолютные значения (количество прикрепленных моноцитов на поперечный срез) и выражаются в виде средних значений ± SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 14

		Количество моноцитов на поперечный срез
Контрольное АВ	AVG	3,4
	SD	1,2
Эвинакумаб	AVG	3,5
	SD	1,2

Моноциты: Р-величина	Количество моноцитов на поперечный срез
Контроль по сравнению с эвинакумаб	0,983

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Адгезия моноцитов на активированном эндотелии в стенке сосуда корня аорты не подвергалась воздействию обработки эвинакумабом по сравнению с группой контроля.

Атеросклероз: индекс стабильности.

Данные по стабильности бляшек поражений (выраженная в единицах индекса стабильности) суммированы в табл. 15. Индекс стабильности определяется как сумма маркеров стабилизации SMC и содержания коллагена, деленная на сумму дестабилизирующих маркеров макрофагов и некротического содержимого. Это значение обеспечивает измерение стабильности бляшки. Значения представляют собой средние значения $\pm$ SD для 14-15 мышей на группу.

Таблица 15

		Индекс стабильности в Типах IV-V (% SMC+% коллагена) / (% макрофагов+% некроза)
Контрольное АВ	AVG	3,2
	SD	1,3
Эвинакумаб	AVG	3,7
	SD	1,7

Индекс стабильности: Р-величина	Индекс стабильности в Типах IV-V (% SMC+% коллагена) / (% макрофагов+% некроза)
Контроль по сравнению с эвинакумаб	0,329

Непараметрический анализ: U-тест Манна-Уитни.

Обработка эвинакумабом не влияла на индекс стабильности по сравнению с группой контроля.

Вывод.

Аспекты безопасности.

Не было отмечено никакого влияния на массу тела (прибавка) и потребление пищи при обработке эвинакумабом по сравнению с контролем.

Снижение уровня VLDL и LDL.

Мыши APOE*3Leiden.CETP являются хорошо зарекомендовавшей себя моделью для семейной дис-бета-липопротеинемии (FD) у людей, которая характеризуется накоплением остаточных липопротеинов и увеличенным соотношением VLDL-C и LDL-C. Профиль липопротеинов у мышей APOE*3Leiden.CETP отражает соответствующий уровень пациентов с FD с аналогичным ответом на липидонормализующие терапии. Это иллюстрируется сопоставимым снижением холестерина во всех подфракциях ароВ-содержащих липопротеинов при обработке статином и фенофибратом и ниацином.

В настоящем исследовании обработка эвинакумабом значительно уменьшала средний общий холестерин (TC) (-52%, $p < 0,001$) и триглицеридов (TG) (-84%, $p < 0,001$) по сравнению с контролем, который был ограничен не-HDL фракциями.

Уменьшение размера поражения и некротической площади.

В текущем исследовании эвинакумаб значительно снижал размер поражения (-39%, $p < 0,001$) по сравнению с группой контроля. Не было обнаружено существенных различий в количестве поражений,

здоровых сегментов или тяжести поражений.

Обработка эвинакумабом значительно уменьшала некротическое содержание в процентах от общего размера поражения при тяжелых поражениях типа IV-V (с 45%, $p=0,001$), но не влияла на содержание макрофагов, содержание коллагена или площадь SMC, что приводило к аналогичному индексу стабильности поражений как у группы контроля. Эвинакумаб не влиял на рекрутинг моноцитов к активированному эндотелию.

Некротическое содержание было единственным маркером состава бляшек, который изменялся как по абсолютной площади, так и по проценту от общей площади поражения. Потенциальным объяснением может быть сдвиг в составе популяции макрофагов в бляшке от более провоспалительных M1-макрофагов "киллеров" до более исцеляющих M2-макрофагов "репарации", которые могут удалять холестерин из бляшки.

Заключение.

В совокупности, результаты, представленные в этом примере, демонстрируют, что моноклональное антитело против ANGPTL3, эвинакумаб, уменьшает уровень липидов в плазме и предотвращает прогрессирование атеросклероза у мышей APOE*3Leiden.CETP. Эвинакумаб не влияет на количество поражений, тяжесть поражения или стабильность бляшек, но значительно уменьшает площадь поражения и площадь некротического ядра.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, представленными в настоящем описании. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к тем, которые представлены в настоящем описании, станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих его фигур. Подразумевается, что такие модификации охвачены прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения размера поражения и/или некротического содержания атеросклеротических поражений у субъекта у пациента, причем способ включает отбор пациента, который имеет атеросклероз или подвержен риску развития атеросклероза, и введение пациенту одной или более доз ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3), где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, содержат CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащих SEQ ID NO: 2/3, где пациент получает стабильную фоновую липидонормализующую терапию (LMT) до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3, где стабильная фоновая LMT представляет собой терапию статинами с низкой, умеренной или высокой дозами, и где введение одной или более доз ингибитора ANGPTL3 пациенту приводит к уменьшенному размеру поражения и/или некротическому содержанию атеросклеротических поражений у субъекта.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что у пациента диагностировали гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (HeFH) или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (HoFH) и/или повышенный липопротеин (a) (Lp[a]) до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что у пациента диагностировали сердечно-сосудистое заболевание (CVD) до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что пациент перенес инсульт или инфаркт миокарда до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что субъект получал стабильную фоновую липидонормализующую терапию (LMT) одновременно с введением одной или более доз ингибитора ANGPTL3, где стабильная фоновая LMT представляет собой терапию статинами с низкой, умеренной или высокой дозами.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что введение пациенту одной или более доз ингибитора ANGPTL3 приводит к одному или более терапевтическим последствиям, выбранным из группы, состоящей из:

- (a) снижения уровня общего холестерина (TC) в сыворотке,
- (b) снижения уровня триглицеридов (TG) в сыворотке,
- (c) снижения уровня липопротеинов низкой плотности (LDL) в сыворотке и
- (d) снижения уровня липопротеинов очень низкой плотности (VLDL) в сыворотке,

где снижение (a), (b), (c) и/или (d) определяется относительно уровня TC в сыворотке пациента, уровня TG в сыворотке пациента, уровня LDL в сыворотке пациента и/или уровня VLDL в сыворотке пациента до или в момент начала лечения с использованием одной или более доз ингибитора ANGPTL3.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что введение одной или более доз ингибитора ANGPTL3 пациенту приводит к уменьшению образования атеросклеротических бляшек.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, содержат аминокислотные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей, имеющие SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, представляют собой эвинакумаб.

11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий введение пациенту одной или более доз ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с PCSK9.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с PCSK9, выбирают из группы, состоящей из алирокумаба, эволокумаба, бокоцизумаба, лоделцизумаба и ралпанцизумаба.

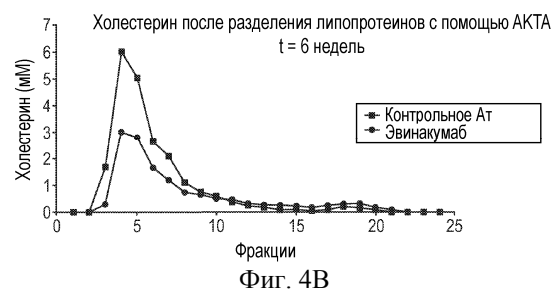
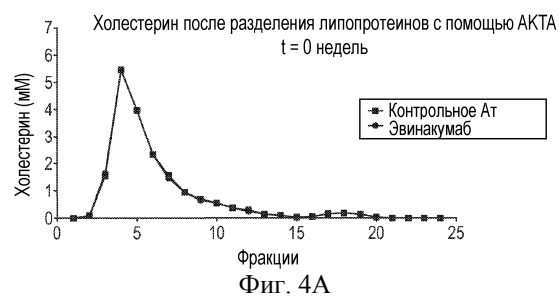
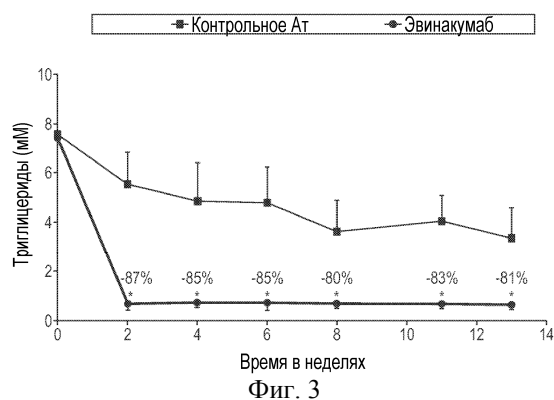
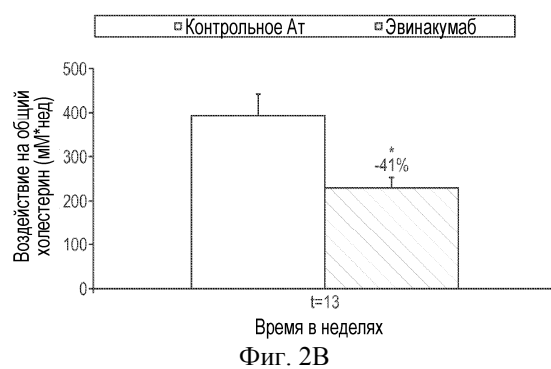
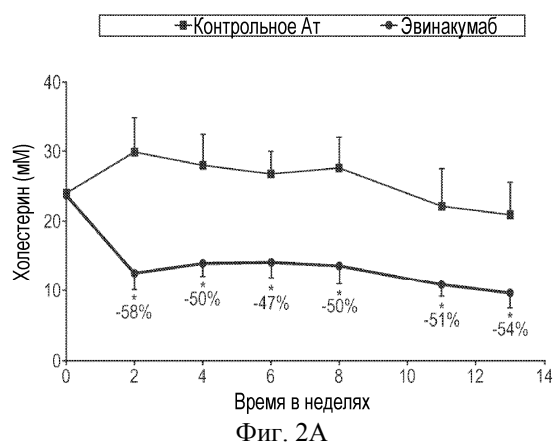
13. Способ по любому из пп.1-12, дополнительно включающий введение пациенту одной или более доз ингибитора ANGPTL4 и/или ANGPTL8, где ингибитор ANGPTL4 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL4, где ингибитор ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL8.

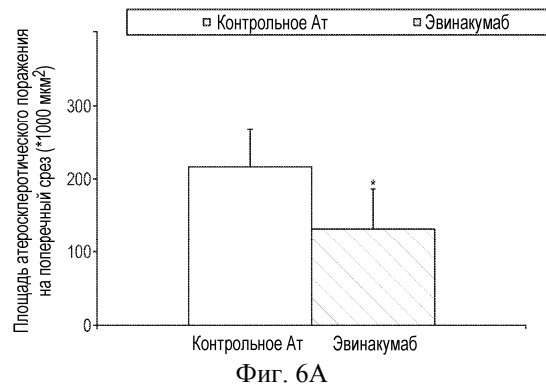
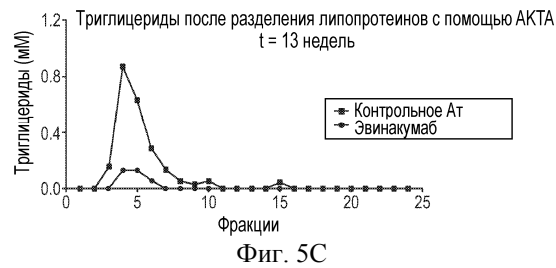
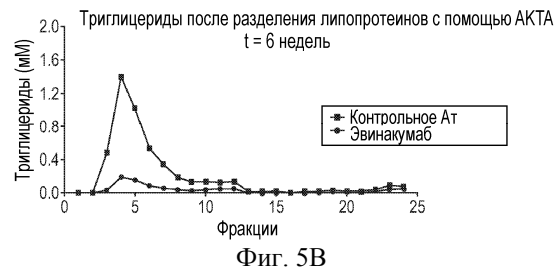
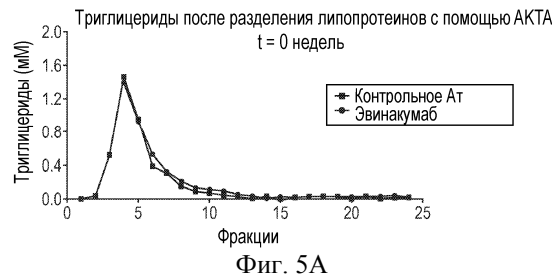
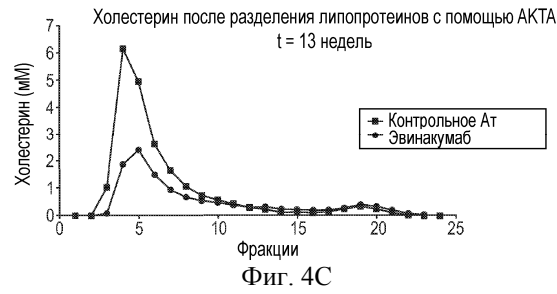
14. Применение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) в предотвращении или ослаблении атеросклероза у пациента, где пациент страдает атеросклерозом или подвержен риску развития атеросклероза, и где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, содержат CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащих SEQ ID NO: 2/3, и где пациент получает стабильную фоновую липидонормализующую терапию (LMT) до или в момент начала лечения.

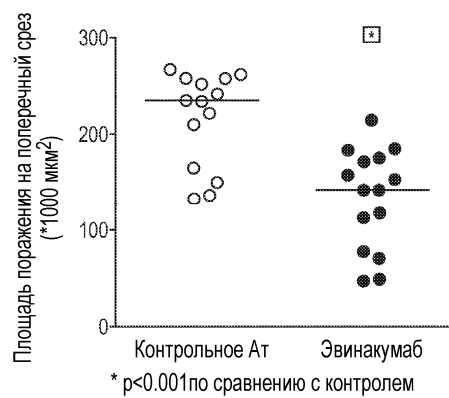
15. Применение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) при получении лекарственного средства для предотвращения или ослабления атеросклероза у пациента, где пациент страдает атеросклерозом или подвержен риску развития атеросклероза, и где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с ANGPTL3, содержат CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащих SEQ ID NO: 2/3, и где пациент получает стабильную фоновую липидонормализующую терапию (LMT) до или в момент начала лечения.

Неделя обработки:	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Группа 1: контроль 25 мг/кг/нед	X				X													X
Группа 2: эвинакумаб 25 мг/кг/нед	X				X													X
Соответствие					X													
Еженедельные подкожные инъекции					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Масса тела и потребление пищи					X			X			X		X			X		X
Холестерин и TG в плазме					X		X		X		X		X			X		X
Сбор плазмы					X		X		X		X		X			X		X
Липопротеиновые профили					X						X							X
Сбор кала																	X	
Умерщвление (оценка атеросклероза)																		X

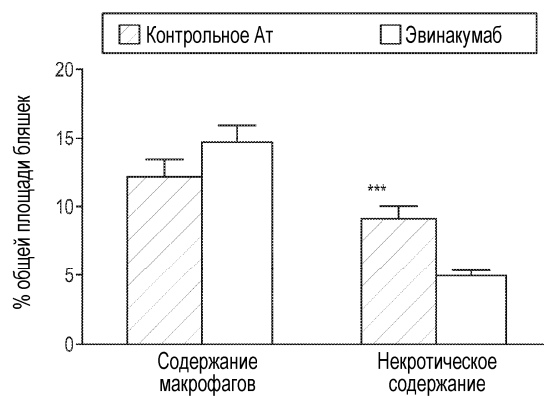
Фиг. 1



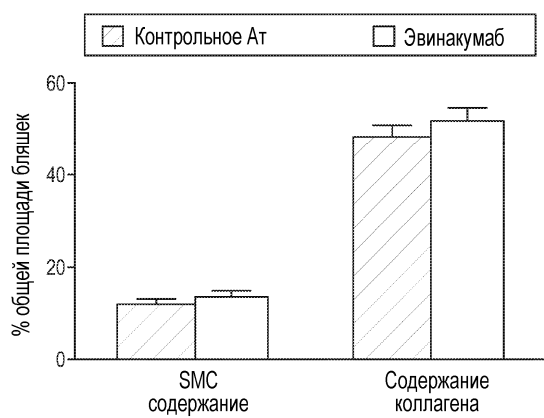




Фиг. 6В



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2