

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291526 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.11

(22) Дата подачи заявки
2020.11.18

(51) Int. Cl. C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(54) АНТИ-PCSK9 АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 201911132974.4; 201911133187.1

(32) 2019.11.18

(33) CN

(86) PCT/CN2020/129763

(87) WO 2021/098720 2021.05.27

(71) Заявитель:
АД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь,
Цзинь Сяопин (CN)

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

(57) Представлено анти-PCSK9 антитело и его применение, предпочтительно, для лечения гиперхолестеринемии.

A1

202291526

202291526

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574343EA/55

АНТИ-PCSK9 АНТИТЕЛО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к области медицинской технологии и, в частности, к лечению гиперхолестеринемии, в частности, к применению анти-PCSK9 антител для лечения гиперхолестеринемии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

PCSK9 представляет собой секретируемую сериновую протеазу, которая связывается с рецептором липопротеинов низкой плотности (LDLR) на клеточной поверхности и расщепляет его, что приводит к снижению уровня LDLR на поверхности клеточной мембраны. PCSK9 активно синтезируется и секретируется в кровь печенью. LDLR широко распространены на поверхности клеточной мембраны печени и в клеточных линиях печени, таких как HepG2, Hep3B. Ингибирование связывания PCSK9 с LDLR может поддерживать уровень LDLR на поверхности клеточной мембраны, тем самым опосредуя проникновение LDLR холестерина плазмы в клетки и поддержание уровня холестерина в плазме.

Гиперхолестеринемия представляет собой заболевание, характеризующееся нарушением липидного обмена, при котором у некоторых пациентов может наблюдаться аутосомно-доминантная генетическая мутация, называемая семейной гиперхолестеринемией (FH), в основном проявляющаяся значительным повышением уровня холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C) в плазме. FH можно классифицировать на 4 типа, гетерозиготность, гомозиготность, гетерозиготность соединения и двойная гетерозиготность, среди которых первые два составляют большинство. Гомозиготная семейная гиперхолестеринемия (HoFH) встречается относительно редко, с распространенностью от 1 до 3 на миллион. Заболевание HoFH характеризуется повышенным уровнем LDL-C и повышенным риском раннего атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания. Европейское общество атеросклероза (EAS) утверждает, что у пациентов с HoFH обычно развивается атеросклеротическое сердечно-сосудистое заболевание в возрасте около 20 лет, и они умирают в возрасте около 30 лет без вмешательства. Основные методы лечения HoFH включают терапевтические изменения образа жизни, лекарственные средства и другие методы лечения, такие как обмен липопротеинов плазмы. Статины по-прежнему являются основными лекарственными средствами. Однако для пациентов с HoFH, высокий уровень липидов в крови часто требует комбинации статинов и комбинированной терапии эзетимибом.

Распространенность гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) составляет от примерно 1:500 до 1:200, что означает от примерно 14 до 34 миллионов пациентов с HeFH во всем мире. Известные методы лечения HeFH включают терапевтические изменения образа жизни, лекарственные средства и другие методы

лечения, такие как обмен липопротеинов плазмы. Статины по-прежнему являются важными препаратами. Однако у пациентов с HeFH высокий уровень липидов в крови часто требует комбинированной терапии статинами и эзетимибом.

Ингибиторы PCSK9 могут напрямую предотвращать связывание циркулирующего PCSK9 с LDLR, снижать PCSK9-опосредованную деградацию LDLR, повышать очищающую способность LDLR-C и дополнительно снижать уровень липидов в крови у пациентов на основе основных гиполипидемических агентов. На рынке представлены два моноклональных антитела, таргетирующих PCSK9: алирокумаб и эволокумаб. Алирокумаб (ранее REGN727/SAR236553), полностью человеческое анти-PCSK9 моноклональное антитело, разработанное Regeneron Pharmaceuticals, США, было одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 2015 году в качестве терапии второй линии для снижения LDL-C, и показан взрослым пациентам с наследственной гиперхолестеринемией и взрослым пациентам с атеросклерозом, у которых диетическое вмешательство и лечение статинами оказались неэффективными, и которым требуется снижение LDL-C. 27 августа 2015 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило использование инъекций эволокумаба в комбинации с диетическим контролем и максимально переносимой дозой статинов у пациентов с HoFH и взрослых пациентов с клиническими атеросклеротическими сердечно-сосудистыми заболеваниями. 31 июля 2018 года Национальное управление медицинской продукции (NMPA), КНР одобрило инъекцию эволокумаба для лечения HoFH (т. е. гомозиготной семейной гиперхолестеринемии) у взрослых или подростков в возрасте 12 лет и старше.

Сердечно-сосудистые заболевания являются одним из основных факторов риска смерти у пациентов с гиперлипидемией, и текущие результаты исследований показывают, что эффективные методы лечения гиполипидемии, такие как статины, могут значительно снизить частоту приступов сердечно-сосудистых заболеваний и риск смерти у пациентов с гиперлипидемией. Анти-PCSK9 антитела являются мощными гиполипидемическими агентами, эффективность которых в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний и снижении риска смерти у пациентов с гиперлипидемией также была продемонстрирована. Результаты клинических исследований анти-PCSK9 антитела эволокумаба показали, что лечение эволокумабом может значительно снизить риск сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с гиперлипидемией, и по сравнению с контрольной группой плацебо, частота инфаркта миокарда, инсульта и состояний, требующих процедуры коронарной реваскуляризации, значительно снижается у пациентов, получающих лечение эволокумабом. Крупномасштабные клинические исследования другого продаваемого анти-PCSK9 антитела, алирокумаба, также продемонстрировало защитное действие на сердечно-сосудистую систему. По сравнению с плацебо контролем, анти-PCSK9 антитело может снизить общий риск развития серьезных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, включая острый инфаркт миокарда, ишемический инсульт, смерть при

ишемической болезни сердца (CHD) или нестабильную стенокардию, требующую госпитализации, на 15%. На основании результатов этих клинических исследований, два анти-PCSK9 антитела были одобрены FDA в 2017 и 2019 годах, соответственно, для профилактики сердечных заболеваний и инсульта у взрослых пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один аспект настоящей заявки представляет ингибитор взаимодействия между PCSK9 и LDLR, предпочтительно анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, для лечения гиперхолестеринемии (более предпочтительно, гомозиготной семейной гиперхолестеринемии или «HoFH», или гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии или «HeFH», или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний).

В некоторых конкретных вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9 человека и блокируют связывание PCSK9 человека с LDLR.

В некоторых вариантах осуществления, анти-PCSK9 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления, анти-PCSK9 антитело содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере 80% гомологию, предпочтительно, по меньшей мере, 85% гомологию, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с ней; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% гомологию, предпочтительно, по меньшей мере, 85% гомологию, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с ней.

В некоторых вариантах осуществления, последовательности CDR антитела являются следующими:

HCDR1: GFTFSSYS (SEQ ID NO: 5);
 HCDR2: ISSSSSYI (SEQ ID NO: 6);
 HCDR3: EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO: 7);
 LCDR1: SRNIGGGND (SEQ ID NO: 8);
 LCDR2: GVI (SEQ ID NO: 9); и
 LCDR3: QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO: 10).

Другой аспект настоящей заявки представляет фармацевтическую композицию для лечения гиперхолестеринемии (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-

сосудистых заболеваний), предпочтительно содержащую: ингибитор взаимодействия между PCSK9 и LDLR (и статин) и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор взаимодействия между PCSK9 и LDLR находится в форме, подходящей для парентерального или не парентерального пути введения.

В другом аспекте настоящей заявки представлен набор, предпочтительно, для лечения гиперхолестеринемии (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний), содержащий анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, набор дополнительно содержит статин и/или эзетимиб.

Настоящая заявка дополнительно предназначена, по меньшей мере, для предоставления способа лечения гиперхолестеринемии (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистого заболевания), включающего: введение (например, парентерально или не парентерально) субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора взаимодействия между PCSK9 и LDLR, описанного в настоящем документе (предпочтительно, анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента). Предпочтительно, статин вводят субъекту в комбинации. Более предпочтительно, статин и эзетимиб вводят субъекту в комбинации. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор, статин и/или эзетимиб вводят одновременно или по отдельности.

В некоторых вариантах осуществления, статин представляет собой ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (HMG-CoA).

В некоторых вариантах осуществления, статин, т.е. ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (HMG-CoA), включает ловастатин, правастатин, симвастатин, флувастатин, аторвастатин, розувастатин и питавастатин или любую их комбинацию и т. д.

В некоторых вариантах осуществления, гиперхолестеринемия (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемия у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний) вызвана 1 (парой) или несколькими (парами) аллельных или не аллельных генных мутаций в генах LDLR, аполипопротеина В (ApoB), PCSK9 или адаптерного белка 1 рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLRAP1) и т. д., где мутация аллельного гена включает дисфункциональную мутацию LDLR, мутацию гена ApoB, влияющую на связывание LDL с LDLR, функциональную мутацию, приводящую к повышенной аффинности PCSK9 для LDLR, дисфункциональную мутацию LDLRAP1, приводящую к снижению активности интернализации LDLR, и т. д. Варианты, которые, как известно, вызывают FH в генах LDLR, APOB или PCSK9, описаны, например, в Canadian Journal of Cardiology, 34, (2018), 1553-1563, Canadian Cardiovascular Society Position Statement on Familial

Hypercholesterolemia: Update 2018.

В некоторых вариантах осуществления, гиперхолестеринемия (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемия у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний) демонстрирует LDL-C >13 ммоль/л (500 мг/дл) при предшествующем отсутствии лечения, или LDL-C ≥ 8 ммоль/л (300 мг/дл) при предшествующем лечении (высокой дозой/максимально переносимой дозой статина в комбинации с эзетимибом), в сочетании с ксантомой кожи или сухожилия в возрасте до 10 лет или у обоих родителей, носящих 1 (пару) или несколько (пар) аллельных генных мутаций в генах LDLR, ApoB, PCSK9 или LDLRAP1 и т. д.

В некоторых вариантах осуществления, гиперхолестеринемия (более предпочтительно, HeFH) удовлетворяет следующим а) и b): а) гиперхолестеринемия вызвана 1 (парой) или несколькими (парами) мутаций неспаренного аллельного гена в генах LDLR, аполипопротеина В (ApoB), PCSK9 или адаптерного белка 1 рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLRAP1) и т. д., как описано выше, b) пациент имеет уровень LDL-C в сыворотке $\geq 4,7$ ммоль/л (180 мг/дл) при предшествующем отсутствии лечения лекарственными средством, регулирующим уровень липидов; или удовлетворяет, по меньшей мере, 1 из следующих с) и d) одновременно: с) пациент с ксантомой кожи или сухожилия или пациент в возрасте <45 лет со старческой дугой, и d) имеющий родственника первой степени родства с FH или ранним атеросклеротическое сердечно-сосудистым заболеванием у взрослых (ASCVD), особенно ишемическая болезнь сердца.

Настоящая заявка также предназначена, по меньшей мере, для предоставления использования ингибитора взаимодействия между PCSK9 и LDLR, описанного в настоящем документе (предпочтительно, анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), при получении лекарственного средства для лечения гиперхолестеринемии (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний).

В настоящей заявке также представлен способ лечения пациента с гиперхолестеринемией (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемией у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний), включающий: (i) генотипирование пациента, (ii) измерение уровня LDL-C в образце, взятом у пациента, и (iii) введение пациенту, когда у пациента выявлена гомозиготная (или гетерозиготная) семейная гиперхолестеринемия, терапевтически эффективного количества анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающей части, описанного в настоящем документе, предпочтительно, в комбинации со статином, более предпочтительно, в комбинации со статином и эзетимибом.

В некоторых вариантах осуществления, образец представляет собой сыворотку, плазму или цельную кровь.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения,

гиперхолестеринемия у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистого заболевания относится к одновременному удовлетворению следующих условия 1 и условия 2, где условие 1 удовлетворяет любому из а) - h) (см. Guidelines for Prevention and Treatment of Dyslipidemia in Chinese Adults (2016 Edition): а) ишемическая болезнь сердца в анамнезе (например, острый коронарный синдром, стабильная ишемическая болезнь сердца, пост-реvascularизация, ишемическая кардиомиопатия), b) ишемический инсульт в анамнезе (кроме лакунарного инфаркта), с) преходящая ишемическая атака, d) периферический атеросклероз (например, атеросклероз сонных артерий, пост-каротидная эндалтерэктомия, пост-каротидное стентирование, пост-реvascularизация, атеросклероз нижних конечностей, пост-реvascularизация артерий нижних конечностей), e) $\text{LDL-C} \geq 4,9$ ммоль/л (190 мг/дл) или $\text{TC} \geq 7,2$ ммоль/л, f) больные сахарным диабетом 2 типа в возрасте 40 лет и старше с $1,8 \text{ ммоль/л (70 мг/дл)} \leq \text{LDL-C} < 4,9$ ммоль/л (190 мг/дл), g) хроническая болезнь почек в 3 стадии (т.е. при измеренной и рассчитанной скорости клубочковой фильтрации $30 \text{ мл/мин/1,73 м}^2 \leq \text{eGFR} < 60 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$), h) по меньшей мере, 3 из следующих факторов риска: мужчины в возрасте ≥ 45 лет и женщины в возрасте ≥ 55 лет; артериальная гипертензия; курение; семейный анамнез CVD (для ближайших родственников: мужчины в возрасте < 55 лет и женщины в возрасте < 65 лет); холестерин HDL < 40 мг/дл; ожирение ($\text{ИМТ} \geq 28 \text{ кг/м}^2$); и условие 2 удовлетворяет либо а), либо b): через 4 недели стабильного базового лечения гиполипидемическим агентом: а) уровень $\text{LDL-C} > 1,8$ ммоль/л (70 мг/дл) для пациентов с чрезвычайно высоким риском или b) уровень $\text{LDL-C} > 2,6$ ммоль/л (100 мг/дл) для пациентов с высоким риском.

Настоящая заявка дополнительно предназначена, по меньшей мере, для предоставления способа приготовления фармацевтического состава (фармацевтической композиции) ингибитора взаимодействия между PCSK9 и LDLR (предпочтительно, анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) для лечения гиперхолестеринемии (предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний).

В некоторых вариантах осуществления, анти-PCSK9 антитело вводят в течение 2-недельного (14-дневного) или 4-недельного (28-дневного) цикла и, предпочтительно, подкожно в первый день (D1) каждого цикла. Анти-PCSK9 антитело вводят один раз каждые две недели (q2w) или четыре недели (q4w).

В некоторых вариантах осуществления, относится к разовой дозированной единице, предпочтительно, для лечения семейной гиперхолестеринемии (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистого заболевания), содержащей: 0,1-60 мг анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающий фрагмент, описанного в настоящем документе.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению 0,1-60 мг анти-

PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, для приготовления разовой дозированной формы для лечения семейной гиперхолестеринемии (более предпочтительно, HoFH, HeFH или гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний).

МАБ1

Используемый в настоящем документе MAB1 представляет собой моноклональное анти-PCSK9 антитело, последовательность и структуру которого можно найти в ссылке на патент № WO 2016/127912A1. В моноклональном антителе MAB1, HCDR1 имеет последовательность GFTFSSYS (SEQ ID NO: 5), HCDR2 имеет последовательность ISSSSSYI (SEQ ID NO: 6), HCDR3 имеет последовательность EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO: 7), LCDR1 имеет последовательность SRNIGGGND (SEQ ID NO: 8), LCDR2 имеет последовательность GVI (SEQ ID NO: 9), и LCDR3 имеет последовательность QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO: 10).

Определения и описания

Следующие термины, используемые в настоящем документе, имеют следующие значения, если не указано иное. Определенный термин, если не указано иное, не следует считать неопределенным или неясным, но следует толковать в соответствии с его общепринятым значением в данной области техники. Когда речь идет о торговой марке, подразумевается, что она относится к соответствующему коммерческому продукту, композиции или ее активному ингредиенту.

Используемый здесь термин «антитело» относится к антигенсвязывающему белку, имеющему, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен. Антитело и его фрагмент, описанные в настоящем документе, могут представлять собой целое антитело или любой его фрагмент. Таким образом, антитело и его фрагмент, описанные в настоящем документе, включают моноклональное антитело или его фрагмент и вариант антитела или его фрагмент, а также иммуноконъюгат. Антитело и его фрагмент могут также включать рекомбинантный полипептид, слитый белок и биспецифическое антитело. Анти-PCSK9 антитело и его фрагмент, описанные в настоящем документе, могут относиться к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Термин «изотип» относится к классу антител, кодируемых геном константной области тяжелой цепи. В одном варианте осуществления, анти-PCSK9 антитело и его фрагмент, описанные в настоящем документе, относятся к изотипу IgG1 или IgG4. Анти-PCSK9 антитело и его фрагмент, описанные в настоящем документе, может быть получено из любых видов, включая, помимо прочего, мышь, крысу, кролика, примата, ламу и человека. Анти-PCSK9 антитело и его фрагмент могут быть химерным антителом, гуманизированным антителом или интактным антителом человека.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором антигенсвязывающий сайт получен из вида, отличного от человека, и каркас вариабельной области получен из последовательностей иммуноглобулина человека. Гуманизированное

антитело может содержать замены в каркасных областях, так что каркас может не быть точной копией экспрессированного иммуноглобулина человека или последовательности гена зародышевой линии.

Термин «мутация гена» относится к внезапному наследуемому изменению, происходящему в молекуле геномной ДНК. На молекулярном уровне, мутация гена представляет собой структурное изменение в композиции пар оснований или расположении гена. Она включает мутацию замены оснований, мутацию сдвига рамки считывания, делеционную мутацию и инсерционную мутацию.

Термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое, по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с PCSK9, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от PCSK9). Однако, выделенное антитело, которое специфически связывается с PCSK9, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами (такими как молекулы PCSK9 от разных видов). Более того, выделенное антитело может быть по существу свободным от других клеточных материалов и/или химических веществ.

Термин «моноклональное антитело» («mAb») относится к молекуле антитела или композиции состоящей из одной молекулы. Композиция моноклонального антитела демонстрирует одинарную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу или, в случае биспецифического моноклонального антитела, двойную специфичность связывания в отношении двух разных эпитопов. mAb является примером выделенного антитела. mAb могут быть получены методами гибридом, рекомбинантными методами, трансгенными методами или другими методами, известными специалистам в данной области.

«Антигенсвязывающая часть» (также называемая «антигенсвязывающим фрагментом») антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают Fab фрагменты, Fab' фрагменты, F(ab)' фрагменты, Fv фрагменты, выделенные CDR области, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), F(ab')₂, Fd, dAb, Fab/c, двухвалентные антитела и доменные антитела.

Используемый в настоящем описании термин «полученный», когда он используется для обозначения молекулы или полипептида, связанного с эталонным антителом или другими связывающими белками, означает молекулу или полипептид, которые способны специфически связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или другие связывающие белки.

Используемый в настоящем описании термин «EC₅₀» относится к эффективной концентрации, вызывающей 50% максимального ответа антитела. Используемый в настоящем описании термин «IC₅₀» относится к ингибирующей концентрации, вызывающей 50% максимального ответа антитела. Как EC₅₀, так и IC₅₀ можно измерить с

помощью анализа ELISA или FACS или любого другого способа, известного в данной области техники.

Термин «лечение» или «лечить» обычно относится к действиям, направленным на достижение необходимого фармакологического эффекта и/или физиологического эффекта, с точки зрения полной или частичной профилактики заболевания или его симптома эффект может быть профилактическим, и/или с точки зрения частичной или полной стабилизации или излечения заболевания и/или побочного эффекта заболевания, эффект может быть терапевтическим. Используемый в настоящем описании термин «лечение» или «лечить» охватывает любое лечение заболевания у пациента, включающее (а) профилактику заболевания или симптома у пациента, предрасположенного к заболеванию или симптому, который еще не диагностирован; (b) ингибирование симптома заболевания, т. е. прекращение его развития; или (c) облегчение симптома заболевания, т. е., регресс заболевания или симптома.

Используемый в настоящем описании термин «общее лечение» относится к лечению, при котором лекарственное вещество транспортируется через кровоток для достижения и воздействия на клетки всего организма.

Используемый в настоящем описании термин «субъект» относится к млекопитающему, такому как грызун, кошка, собака и примат. Предпочтительно субъектом согласно настоящей заявке является человек.

«Вводить», «введение» или «введение» означает физическое введение композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с использованием любого из множества способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Пути введения ингибиторов иммунных контрольных точек (например, анти-PCSK9 антитело) включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные способы введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем описании фраза «парентеральное введение» относится к способам введения, за исключением энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, включая, но не ограничиваясь ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию, и электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор иммунной контрольной точки (например, анти-PCSK9 антитело) вводят не парентеральным путем, и в некоторых вариантах осуществления, его вводят перорально. Другие не парентеральные пути включают местный, эпидермальный или мукозальный способы введения, например, интраназальное, вагинальное, ректальное, подязычное или местное введение. Введение также можно осуществлять, например, однократно, многократно и/или в течение одного или нескольких длительных периодов времени.

Используемый в настоящем описании термин «нежелательное явление» (АЕ) представляет собой любой неблагоприятный и часто непреднамеренный или нежелательный признак (включая аномальные лабораторные данные), симптом или заболевание, связанное с использованием медикаментозной терапии. Например, нежелательное явление может быть связано с печенью, секретирующей PCSK9 в ответ на терапию. Медикаментозное лечение может иметь одно или несколько связанных АЕ, и каждое АЕ может иметь одинаковую или разную степень тяжести. Ссылка на способ, способный «изменить нежелательное явление», относится к схеме, которая снижает частоту и/или тяжесть одного или нескольких АЕ, связанных с использованием другой схемы.

Используемый в настоящем описании термин «интервал введения» относится к количеству времени, которое проходит между несколькими дозами состава, описанного в настоящем документе, вводимыми субъекту. Таким образом, интервал введения может быть указан в виде диапазона.

Используемый в настоящем описании термин «частота введения» относится к частоте, с которой дозы состава, описанного в настоящем документе, вводят в течение заданного времени. Частота введения может быть указана как количество введений за заданное время, например, один раз в неделю или раз в две недели.

Термин «базовая доза» относится к дозе, вводимой пациенту без учета веса или площади поверхности тела (BSA) пациента. Таким образом, базовая доза определяется как абсолютное количество лекарственного средства (например, анти-PCSK9 антитела), а не как доза в мг/кг. Например, человек с массой тела 60 кг и человек с массой тела 100 кг получают одинаковую дозу антитела (например, 240 мг анти-PCSK9 антитела).

Термин «фиксированная доза» в отношении композиции, описанной в настоящем документе, означает, что два или несколько различных антител в одной композиции присутствуют в композиции в определенном (фиксированном) соотношении друг к другу. В некоторых вариантах осуществления, базовая доза основана на массе антитела (например, мг). В некоторых вариантах осуществления, фиксированная доза основана на концентрации антитела (например, мг/мл). В некоторых вариантах осуществления, отношение первого антитела (мг) ко второму антителу (мг) составляет, по меньшей мере, примерно 1:1, примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1:6, примерно 1:7, примерно 1:8, примерно 1:9, примерно 1:10, примерно 1:15, примерно 1:20, примерно 1:30, примерно 1:40, примерно 1:50, примерно 1:60, примерно 1:70, примерно 1:80, примерно 1:90, примерно 1:100, примерно 1:120, примерно 1:140, примерно 1:160, примерно 1:180, примерно 1:200, примерно 200:1, примерно 180:1, примерно 160:1, примерно 140:1, примерно 120:1, примерно 100:1, примерно 90:1, примерно 80:1, примерно 70:1, примерно 60:1, примерно 50:1, примерно 40:1, примерно 30:1, примерно 20:1, примерно 15:1, примерно 10:1, примерно 9:1, примерно 8:1, примерно 7:1, примерно 6:1, примерно 5:1, примерно 4:1, примерно 3:1 или примерно 2:1. Например, соотношение 3:1 первого антитела и второго антитела может означать, что флакон может содержать

около 240 мг первого антитела и 80 мг второго антитела или около 3 мг/мл первого антитела и 1 мг/мл второго антитела.

«Пациент» (иногда обозначаемый как «субъект») включает любого человека или животное, отличное от человека. Термин «животное, отличное от человека» включает, но не ограничен ими, позвоночных, таких как приматы, овцы, собаки, и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления, пациент представляет собой человека. Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо в определенных контекстах.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного средства, которое, при применении отдельно или в сочетании с другим терапевтическим агентом, защищает пациента от начала заболевания или способствует регрессу заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или профилактики повреждений или инвалидности, вызванных заболеванием. Способность терапевтического средства способствовать регрессу заболевания может быть оценена с использованием различных способов, известных специалистам-практикам, таких как клинические испытания на человеке, система животных моделей, которая прогнозирует эффективность для человека, или путем определения активности лекарственного средства в анализе *in vitro*.

Термины «примерно», «приблизительно» или «по существу содержит» относятся к значению или составу в пределах приемлемого диапазона погрешности от конкретного значения или состава, как определено специалистами в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение или композиция измеряются или определяются, т. е. ограничений системы измерения. Например, «примерно», «приблизительно» или «по существу включают» могут относиться к тому, чтобы быть в пределах 1 или более чем 1 стандартного отклонения, как это практикуется в данной области техники. Альтернативно, «примерно» или «по существу содержат» могут относиться к диапазону, который отличается на 10% или 20% (т.е. $\pm 10\%$ или $\pm 20\%$) от измененного параметра или значения. Например, около 3 мг может включать любое число от 2,7 до 3,3 мг (для 10%) или от 2,4 до 3,6 мг (для 20%). Кроме того, в частности, в отношении биологических систем или процессов, термин может относиться к величине, на порядок или не более чем в 5 раз больше числового значения. Когда конкретное значение или композиция представлена в настоящей заявке и формуле изобретения, если не указано иное, значение «примерно» или «по существу включает» следует рассматривать, как находящееся в допустимом диапазоне ошибок от конкретного значения или композиции.

Используемый в настоящем описании термин «примерно один раз в неделю», «примерно один раз в две недели» или любой другой аналогичный термин интервала введения относится к приблизительному значению. «Примерно один раз в неделю» может включать один раз каждые 7 ± 1 дней, т.е. каждые 6-8 дней. «Примерно раз в две недели»

может включать один раз в 14 ± 3 дня, т. е. один раз в каждые 11-17 дней. Аналогичные приблизительные значения применимы, например, примерно один раз в 3 недели, примерно один раз в 4 недели, примерно один раз каждые 5 недель, примерно один раз каждые 6 недель и примерно один раз каждые 12 недель. В некоторых вариантах осуществления, интервал введения примерно один раз каждые 6 недель или примерно один раз каждые 12 недель означает, что первую дозу можно вводить в любой день первой недели, и затем вторую дозу можно вводить в любой день шестой или двенадцатой недели, соответственно. В других вариантах осуществления, интервал введения примерно один раз каждые 6 недель или примерно один раз каждые 12 недель означает, что первая доза вводится в определенный день (например, в понедельник) первой недели, и затем вторую дозу вводят в тот же день (например, в понедельник) шестой или двенадцатой недели, соответственно. Аналогичные принципы применяются к фразам, включая, но не ограничиваясь ими, «примерно раз в 2 недели», «примерно раз в каждые 2 недели», «примерно один раз каждый месяц» и т.д.

Как использовано в настоящем документе, если не указано иное, любой диапазон концентраций, диапазон долей, диапазон отношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и включающий, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую часть числа).

Если не указано иное, «примерно» или «приблизительно» в настоящей заявке означает нахождение в пределах $\pm 5\%$, предпочтительно, в пределах $\pm 2\%$ и более предпочтительно, в пределах $\pm 1\%$ от указанного числового диапазона. Например, pH около 5,5 означает pH $5,5 \pm 5\%$, pH $5,5 \pm 2\%$ и, более предпочтительно, pH $5,5 \pm 1\%$.

Термин «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем описании для тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск.

Термин «фармацевтический состав» или «фармацевтическая композиция» относится к смеси, состоящей из активного ингредиента (например, анти-PCSK9 антитела), описанного в настоящем документе, и фармацевтически приемлемого эксципиента. Фармацевтическая композиция предназначена для облегчения введения активного ингредиента, описанного в настоящем документе, субъекту.

Термин «разовая дозированная единица» означает одну фармацевтическую дозированную форму, такую как ампула, содержащая анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в настоящем документе, для введения субъекту в определенные моменты времени схемы, предпочтительно, на кг массы тела субъекта.

Схемы введения

Приведенное ниже содержание не предназначено для ограничения способов введения лекарственного средства, описанного в настоящем документе.

В одном варианте осуществления, лекарственное средство, описанное в настоящем документе, может быть приготовлено в виде фармацевтической композиции, подходящей для однократной дозы или многократных доз.

Лекарственное средство, описанное в настоящем документе, вводят различными надлежащими путями, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное введение или парентеральное введение (внутривенным, внутримышечным, местным или подкожным путем). В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, описанное в настоящем документе, вводят путем перорального введения или инъекции, например, внутривенной инъекции или внутрибрюшинной инъекции.

Подходящие дозированные формы лекарственного средства, описанного в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, таблетку, пастилку, пилюлю, капсулу (например, твердую капсулу, мягкую капсулу, кишечнорастворимую капсулу и микрокапсулу), эликсир, гранулу, сироп, инъекцию (внутримышечную, внутривенную и внутрибрюшинную), гранулы, эмульсии, суспензии, растворы, порошки и дозированные формы составов с замедленным высвобождением для перорального или не перорального введения.

Описанная в настоящем описании фармацевтическая композиция содержит приемлемый носитель и/или эксципиент.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 показано влияние MAB1 на LDL-C в сыворотке мыши.

На ФИГ. 2 показано влияние MAB1 на LDL-C в сыворотке яванского макака (п/к: подкожная инъекция; в/в: внутривенная инъекция).

На ФИГ. 3 показано влияние MAB1 на эндоцитоз LDL клетками HepG2.

На ФИГ. 4 показано, что MAB1 ослабляет ингибирование эндоцитоза LDL с помощью PCSK9 дикого типа.

На ФИГ. 5 показано, что MAB1 ослабляет ингибирование эндоцитоза LDL с помощью функционально усиленного мутанта PCSK9 (PCSK9-D374Y).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящая заявка дополнительно описана ниже со ссылкой на конкретные примеры, которые, однако, приведены только для иллюстрации и не ограничивают объем настоящей заявки. Аналогичным образом, настоящая заявка не ограничивается каким-либо конкретным предпочтительным вариантом осуществления, описанным в настоящем документе. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что эквивалентные замены и соответствующие модификации технических характеристик настоящей заявки по-прежнему подпадают под объем защиты настоящей заявки. Если не указано иное, реагенты, используемые в следующих примерах, являются коммерчески доступными продуктами, и растворы могут быть приготовлены обычными методами в данной области техники.

В следующих примерах настоящего изобретения изотипическим контролем антитела является антитело IgG человека против лизоцима куриного яйца (анти-HEL; т. е. IgG человека, сокращенно hIgG), и его последовательность была взята из Affinity Maturation Increases the Stability and Plasticity of the Fv Domain of Anti-Protein Antibodies (Acierno et al., J Mol Biol., 2007, 374(1):130-46, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO:11, и аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 12). Антитело для изотипического контроля получено в лаборатории Akeso Biopharma, Inc.

В следующих примерах настоящего изобретения, мышей C57BL/6 приобретают в Центре животных медицинской лаборатории Гуандуна.

Пример 1. Получение гуманизированного анти-PCSK9 антитела.

1. Дизайн антитела

Для получения моноклонального антитела MAB1, авторы изобретения разработали ряд последовательностей антител на основе известной последовательности белка PCSK9 (NP_777596.2) и его трехмерной кристаллической структуры. Посредством тщательного скрининга и анализа, в конечном итоге получают антитело MAB1, которое специфически связывается с PCSK9. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи моноклонального антитела и их кодирующие последовательности представлены в SEQ ID NO: 1-4 ниже.

ДНК последовательность VH тяжелой цепи сконструированного MAB1 выглядит следующим образом (369 п.н.):

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGAAGATCTC
TGAGACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGATTCACCTTTAGCTCCTACAGCATGAAGTGGG
TGCGGCAGGCTCCTGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCGGAATCTCTAGTTCAAGCT
CCTACATTAGCTATGCAGACTCCGTCCAGGGAAGGTTACCATCTCTCGCGATAACG
GCAAGAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCAGAGGACACAGCCCTG
TACTTCTGTGCCAGAGAATATGACTTCTGGTCCGCCTATTACGACGCCTTCGATGTCT
GGGGACAGGGGACTATGGTCACTGTCTCAAGC (SEQ ID NO: 1)

Белковая последовательность кодируемой VH выглядит следующим образом (123 а.к.):

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGISS
SSYISYADSVQGRFTISRDNKGKNSLYLQMNSLRAEDTALYFCAREYDFWSAYYDAFDV
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO: 2)

ДНК последовательность VL легкой цепи MAB1 выглядит следующим образом (333 п.н.):

CAGAGCGAACTGACTCAGCCAAGAAGCGTCAGTGGATCACCTGGCCAGAGC
GTGACAATCTCCTGCACCGGCACAAGCAGGAACATTGGCGGGGGAAATGACGTCCA
CTGGTACCAGCAGCATCCAGGGAAGGCCCCCAAAGTCTGATCTCCGGAGTGATTG
AGCGGAGCTCCGGCGTCCCCGATAGATTCAGCGGGTCCAAGTCTGGAAACACAGCT
TCTCTGACTATCAGTGGCCTGCAGGCAGAGGACGAAGCCGATTACTATTGCCAGTCT

TTCGACGGCAGTCTGTCAGGGAGCGTGTTTGGCACTGGGACCGATGTGACCGTCCTG
(SEQ ID NO: 3)

Белковая последовательность кодируемого VL выглядит следующим образом (111 а.к.):

QSELTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSRNIGGGNDVHWYQQHPGKAPKLLISGVIER
SSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCQSF DGSLSGSVFGTGTDTVTL (SEQ
ID NO: 4)

Последовательности CDR антитела следующие:

HCDR1: GFTFSSYS (SEQ ID NO: 5);

HCDR2: ISSSSSYI (SEQ ID NO: 6);

HCDR3: EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO: 7);

LCDR1: SRNIGGGND (SEQ ID NO: 8);

LCDR2: GVI (SEQ ID NO: 9); и

LCDR3: QSF DGSLSGSV (SEQ ID NO: 10).

2. Экспрессия и очистка антитела

Последовательность кДНК тяжелой цепи (кодирующая последовательность, указанная в SEQ ID NO: 1; константная область представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, ДОСТУП: P01857) и последовательность кДНК легкой цепи (кодирующая последовательность, указанная в SEQ ID NO: 3; константная область представляет собой С-область цепи Ig лямбда-2; ДОСТУП: P0CG05.1) MAB1 отдельно клонируют в векторы pUC57simple (поставляемые GenScript) и получают плазмиды pUC57simple-MAB1H и pUC57simple-MAB1L, соответственно. Плазмиды pUC57simple-MAB1L расщепляют (HindIII и EcoRI), и тяжелые и легкие цепи, выделенные с помощью электрофореза, отдельно субклонируют в векторы pcDNA3.1, и рекомбинантные плазмиды экстрагировали для котрансфекции клеток 293F. Через 7 дней культивирования клеток, культуральную среду отделяют центрифугированием на высокой скорости, и супернатант концентрируют и загружают в колонку HiTrap MabSelect SuRe. Белок элюируют в одну стадию элюирующим буфером. Образец мишени выделяют, и буфер меняют на PBS.

Пример 2. Влияние MAB1 на холестерин липопротеинов низкой плотности LDL-C в сыворотке животных

(1) Влияние MAB1 на уровень холестерина липопротеинов низкой плотности LDL-C в сыворотке мышей

Сыворотку выделяют из образца орбитальной крови, собранного у 32 мышей C57BL/6 перед введением. Холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C) у мышей определяют с помощью полностью автоматизированного биохимического анализатора (Mindray, модель BS-180). Как показано в таблице 1, мышей делят на 4 группы по 8 мышей, т.е. нормальную группу, модельную группу, группу с низкой дозой MAB1 и группу с высокой дозой MAB1, и лечат в соответствии со схемой дозирования, указанной в таблице 1. Сыворотку отделяют от собранных образцов крови до введения (D0), и после введения в D3, D7, D10, D14 и D18, и определяют содержание холестерина

липопротеинов низкой плотности.

Результаты показаны на ФИГ. 1. Результаты эксперимента показали, что по сравнению с модельной группой, концентрация LDL-C в сыворотке мышей значительно снижена в группе, получавшей MAB1 с низкой дозой 60 мг/кг и MAB1 с высокой дозой 120 мг/кг ($P < 0,05$ или $P < 0,01$).

Таблица 1. Дозировка и схема введения MAB1 для мышей

Группа	Количество животных	Схема забора крови	Схема дозирования (включая лечение, дозировку, место, частоту и т. д.)
Нормальная группа	8	Сыворотку выделяют из образцов крови, собранных до введения (D0) и после введения в D3, D7, D10, D14 и D18, и определяют содержание холестерина липопротеинов низкой плотности	Солевой раствор, п/к, D0
Модельная группа	8		hIgG, 60 мг/кг, п/к, D0
MAB1 60мг/кг	8		MAB1, 60 мг/кг, п/к, D0
MAB1 120мг/кг	8		MAB1, 120 мг/кг, п/к, D0

Примечание: первую дозу дают в D0 (день 0); п/к: подкожное введение;

Влияние MAB1 на уровень холестерина липопротеинов низкой плотности LDL-C в сыворотке яванского макака

Эксперимент проводят с использованием 12 самцов и 12 самок яванских макаков (обычного вида), приобретенных у Nanning Deheng Biotechnology Ltd. (лицензия на разведение животных № SCXK(GUI)2011-0007; сертификат лабораторного животного № 0005869). Все процедуры и действия, связанные с использованием и благополучием животного были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) до проведения процедур. № разрешения IACUC: ACU16-467.

Как показано в таблице 2, животных рандомизируют по полу в группу с низкой дозой MAB1, группу с умеренной дозой MAB1, группу с высокой дозой MAB1 и группу с внутривенным введением MAB1 с использованием компьютерной программы на основе веса животных, измеренного до введения дозы, и подвергают лечению в соответствии со схемой дозирования в таблице 2. Примерно 0,5 мл крови собирают натощак в D0 до введения и через 4 ч, а также в D2, D4, D6, D8, D11, D15, D18 и D22 после введения. Образцы крови переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 2-8°C при 3000 g. Определяют холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C).

Результаты показаны на ФИГ. 2. Выводы: MAB1 вводят яванским макакам в виде однократной подкожной инъекции в дозах 3, 10 и 30 мг/кг и однократной внутривенной инъекции в дозе 10 мг/кг. Холестерин липопротеинов низкой плотности у яванских

макаков значительно снижается после введения. Уровень липидов в крови в группе с дозой 3 мг/кг в основном возвращается к исходному уровню примерно через 15 дней после введения; уровень липидов в крови в группах с дозой 10 мг/кг п/к и в/в введения также в основном возвращается к исходному уровню примерно через 22 дня после введения, и уровень липидов в крови в группе с дозой 30 мг/кг остается значительно ниже исходного уровня.

Таблица 2. Дозировка и схема введения MAB1 для яванских макаков

Группа	Количество животных	Схема забора крови	Схема дозирования
Группа с низкой дозой	6	Примерно 0,5 мл крови собирают натошак в D0 до введения и через 4 ч, а также в D2, D4, D6, D8, D11, D15, D18 и D22 после введения. Из образцов крови отделяют сыворотку и определяют содержание холестерина липопротеинов низкой плотности.	MAB1, 3 мг/кг, п/к, D0
Группа средней дозы	6		MAB1, 10 мг/кг, п/к, D0
Группа высокой дозы	6		MAB1, 30 мг/кг, п/к, D0
Группа внутривенного введения	6		MAB1, 10 мг/кг, в/в, D0

Примечание: первую дозу вводят в D0 (день 0); п/к: подкожное введение; в/в: внутривенное введение; животные рандомизированы по полу на 4 группы, каждая из которых состоит из 3 самцов и 3 самок, с использованием компьютерной программы на основе веса животных, измеренного перед дозированием.

Пример 3. Влияние MAB1 на эндоцитоз LDL клетками HepG2.

PCSK9 может ингибировать экспрессию LDLR на поверхности клеток HepG2, опосредуя эндоцитоз и деградацию LDLR. LDL может связываться с LDLR и быть эндоцитозирован клеткой. BODIPY-меченый LDL (BODIPY-LDL, Life, кат. №: L3483) может использоваться в качестве метки для связывания с LDLR и может быть эндоцитозирован клеткой. Значение флуоресценции внутриклеточного BODIPY-LDL может быть обнаружено, чтобы отразить LDLR-опосредованный эндоцитоз LDL. Если PCSK9 присутствует и связывается с LDLR, количество LDLR на клеточной поверхности уменьшается, что снижает связывание BODIPY-LDL с LDLR и ингибирует эндоцитоз LDL, напротив, ингибирование PCSK9 усиливает эндоцитоз LDL клетками HepG2. Следовательно, тест-система может измерять фармакологическую активность анти-PCSK9 антитела путем определения эндоцитарной активности клеток HepG2 на BODIPY-LDL.

Методики: 50 мкл раствора полилизина (Поли-L-лизин) добавляют в каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования клеток с черным дном для покрытия.

Планшет инкубируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 2 часов, и раствор для покрытия отбрасывают. Планшет один раз промывают 100 мкл PBS и сушат для последующего использования. Клетки HepG2 расщепляют обычным способом, ресуспендируют в среде для анализа (DMEM с 1% NEAA), подсчитывают и высевают при 2×10^4 клетки/лунку на 96-луночном планшете для культивирования клеток с черным дном в объеме 80 мкл/лунку. Клетки инкубируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 18 часов. PCSK9 предварительно разводят до 6000 нМ средой для анализа (DMEM с 1% NEAA) и добавляют в планшет в количестве 10 мкл/лунка. Антитело разводят в 10 раз и добавляют по 10 мкл/лунка. Смесь инкубируют при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 часов. Затем в каждую лунку добавляют 10 мкл 0,1 мг/мл раствора BODIPY-LDL и смесь инкубируют в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение 22 часов. Среду отбрасывают, и в каждую лунку добавляют 200 мкл PBS для промывки. Для фиксации клеток добавляют раствор формальдегида, и клетки выдерживают при комнатной температуре на 20 мин. Раствор формальдегида удаляют и добавляют PBS для промывки. Наконец, PBS отбрасывают, и в каждую лунку добавляют 100 мкл PBS. Относительную единицу флуоресценции BODIPY определяли с помощью многоканального тестера для микропланшетов при длине волны возбуждения 490 нм, длине волны испускания 520 нм и отсечкой 515 нм.

Результаты представлены в таблице 3 и на ФИГ. 3. Значение EC₅₀ для MAB1, снижающее ингибирование эндоцитоза LDL в клетках HepG2 с помощью PCSK9, составляет 12,99 мкг/мл.

Выводы: MAB1 может ингибировать активность PCSK9, повышая эндоцитоз LDL в клетках HepG2, EC₅₀ для MAB1 составляет 12,99 мкг/мл.

Таблица 3. Анализ эндоцитоза LDL в клетках HepG2 с помощью MAB1

МAB1 концентрация (мкг/мл)	ОЕФ	Среднее		СОС
120	1432819	1501195	1467007	34188
40	1421783	1233042	1327413	94370,5
28	1294536	1179255	1236896	57640,5
16	1145831	1002411	1074121	71710
6,4	267495	227003	247249	20246
2,56	412355	282301	347328	65027
1,024	341749	236159	288954	52795
0,4096	222579	229323	225951	3372
0,16384	203970	192901	198435,5	5534,5

Пример 4. MAB1 ослабляет ингибирование эндоцитоза LDL с помощью мутанта PCSK9 дикого типа и с улучшенными функциональными возможностями

PCSK9 имеет несколько мутантов и подразделяется на два типа: с приобретением

функции и с потерей функции в зависимости от влияния мутации на регуляцию уровня LDL-C с помощью PCSK9. Мутация с приобретением функции усиливает способность PCSK9 к повышать уровень холестерина LDL-C, что приводит к гиперхолестеринемии, и в основном включает S127R, D129G, F216L, R218S, D374Y, N425S, R496W, H553R, E670G и т. д.

Среди них мутация D374Y (Asp374Tyr) увеличивает сродство PCSK9 к LDLR в 5-30 раз (Lagace TA et al., J. Clin. Invest., 2006, 116(11):2995-3005; Cunningham D et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2007, 14(5):413-419; Fisher TS et al., J. Biol. Chem., 2007, 282(28): 20502-20512).

Взяв в качестве примера мутантный белок D374Y (Asp374Tyr), в этом эксперименте исследуют активность MAB1 в отношении ингибирования эндоцитоза LDLR, опосредованного функционально усиленным мутантным белком PCSK9. Результаты показывают, что MAB1 может эффективно ослаблять ингибирование эндоцитоза LDLR за счет приобретения функции белка PCSK9.

Материалы: HepG2 (приобретен у Китайской академии наук, P14); DMEM (Gibco, кат. № 11995040); FBS (Excell Bio, кат. № FSP500); MEM NEAA (100x) (Gibco, кат. № 11140-050); POLY-L-LYSINE (SIGMA, кат. № P4832); BODIPY-LDL (Life, кат. № L3483); PCSK9-his (получен Akeso Biopharma); PCSK9(D374Y)-his (Acrobio, кат. № PCY-H5225); эволокумаб (приобретен у AMGEN).

Методики: 96-луночный планшет для культивирования клеток с черным дном покрывают 50 мкл 0,01% поли-L-лизина. Планшет инкубируют при 37°C, в инкубаторе 5% CO₂ в течение 2 часов, после чего раствор для покрытия удаляют. Планшет промывают один раз 100 мкл PBS и сушат для последующего использования. Для клеток HepG2 в log фазе, среду для выращивания (12% FBS, DMEM с 1% NEAA) удаляют. Клетки ресуспендируют в среде для анализа (DMEM с 1% NEAA) после трипсинизации и подсчитывают. Клетки высевают по 20000 клеток/лунку на 96-луночные черные планшеты для культивирования клеток в объеме 80 мкл/лунку и инкубируют при 37°C/5% CO₂ в течение ночи. На следующий день, PCSK9 и антитело (с конечными концентрациями, показанными на фигуре) разводят в среде для анализа и добавляют в 96-луночный планшет в конечном объеме 100 мкл. Планшет для культивирования клеток инкубируют при 37°C/5% CO₂ в течение 21 ч. Планшет для культивирования вынимают и добавляют 10 мкл 0,1 мг/мл BODIPY-меченого раствора LDL. Смесь культивируют при 37°C/5% CO₂ в течение 9 ч. Среду удаляют, в каждую лунку добавляют 200 мкл PBS для промывки, в каждую лунку добавляют 100 мкл PBS. Относительную единицу флуоресценции (ОЕФ) планшета определяют многоканальным микропланшетным тестером при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 535 нм.

Результаты: как показано в таблице 4, на ФИГ. 4 и ФИГ. 5, MAB1 может эффективно связываться с PCSK9 дикого типа и функционально улучшенной мутантной PCSK9 (PCSK9-D374Y) и эффективно блокировать PCSK9 от ингибирования эндоцитоза LDL, что эквивалентно активности коммерчески доступного препарата эволокумаб с той

же мишенью.

Таблица 4. EC₅₀ MAB1 для ингибирования эндоцитоза LDLR с помощью мутанта дикого типа и мутанта PCSK9 с приобретением функции

	EC ₅₀ (мкг/мл)	
	MAB1	Эволокумаб
PCSK9 дикого типа	32,87	30,79
Функционально улучшенный мутант PCSK9 (PCSK9-D374Y)	1,102	1,259

Пример 4. MAB1, ослабляющий ингибирование мутантного LDLR-опосредованного эндоцитоза LDL с помощью PCSK9 дикого типа

Связывание белка PCSK9 с LDLR регулирует метаболизм LDL-C. Мутации гена LDLR многочисленны и могут быть разделены на следующие в зависимости от синтеза и функции белка LDLR: 1) мутации LDLR без экспрессии, включая аллель LDLR без мутации (т. е. LDLR не экспрессируется клетками), например, мутация промоторной последовательности, нонсенс-мутация, мутация сдвига рамки считывания и мутация сплайсинга, и дефекты транспорта LDLR, т. е. дефектные LDLR не могут транспортироваться из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи после синтеза и затем накапливаться и разлагаться в клетках; 2) мутация гена с дефицитом связывания, т. е. аномальный LDLR, кодируемый мутантным геном, может транспортироваться и экспрессироваться на клеточной поверхности, но имеет сниженную или устраненную активность связывания LDL-C; 3) генная мутация с дефицитом интернализации, т. е. рецептор, который связывается с LDLR, но не может подвергаться эндоцитозу, накапливается, покрывая кавеолы из-за мутации в кодоне, кодирующем последовательность NPVY; 4) генные мутации с дефицитом рециркулирования, т. е. рецептор способен связываться с LDL-C и опосредовать эндоцитоз, но будет перевариваться одновременно с LDL-C в лизосомах, что приводит к неспособности LDLR рециркулировать на клеточную поверхность. Используя LDLR дикого типа (с аминокислотой D в положении 227, что соответствует следующему мутантному LDLR (D227E)) и мутантный LDLR (D227E; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/3690/>) в качестве контроля, в этом эксперименте оценивают активность различных мутантных LDLR в отношении эндоцитоза LDL, ингибирование различных мутантов LDLR на эндоцитозе LDL с помощью PCSK9, и может ли ингибирование эндоцитоза LDL с помощью PCSK9 эффективно ослабляться с помощью MAB1.

Методики: клетки 293Т высевают на планшете обычным переваром и высевают на 6-луночные планшеты по 5 x 10⁵ клеток на лунку. Добавляют 2 мл DMEM+10% FBS+1% биспецифического антитела (Penicillin Streptomycin, Gibco, кат. № 15140-122), и клетки инкубируют в течение ночи в инкубаторе. Среду заменяют за 2 ч до трансфекции в 1 мл бессывороточной среды Opti-MEM. Плазмидную ДНК-мишень (сконструированную

Akeso Biopharma, Inc., см. Таблицу 5, на основе LDLR дикого типа, с использованием аминокислоты, кодируемой кодоном инициации в положении 1, и после проведения сайт-специфического мутагенеза соответствующего положения согласно Таблице 5, ДНК встраивают в лентивирусную плазмиду pCDH-CMV-MCS-EF1-puro приобретенную у YouBio, с получением плазмид в таблице 5) и PEI (Polyscience, кат. № 23966) по отдельности разводят Opti-MEM, с плазмидами-мишенями и контрольными плазмидами (сконструированными Akeso Biopharma, Inc., см. Таблицу 5), каждая по 2 мкг, и PEI по 10 мкг (отдельная трансфекция 5 мкг PEI). Разведенную ДНК и PEI хорошо перемешивают и инкубируют в течение 15 мин, затем медленно по каплям добавляли в 6-луночные планшеты, осторожно перемешивают и инкубируют в инкубаторе в течение ночи. Среду в 6-луночных планшетах заменяют на 2 мл DMEM+10% FBS, и клетки инкубируют в инкубаторе для дальнейшей инкубации. Через 48 ч трансфекции, клетки собирают путем расщепления 0,05% панкреатином-ЭДТК, центрифугируют и подсчитывают. Часть клеток добавляют в планшет для анализа репортера в количестве 2×10^5 клеток/лунку и добавляют 100 мкл DMEM+10% FBS, PBS и IL-6 (Akeso Biopharma, № партии: 20150421) (50 нг/мл). Клетки инкубируют в течение ночи и добавляют 50 мкл субстрата (система анализа люциферазы Bright-Glo™, Promega, партия: E2620) для считывания ОЕФ. Другую часть клеток используют для анализа эндоцитоза LDL (FACS) с использованием 200 мкл Opti-MEM+1% NEAA. Клетки добавляют в количестве 2×10^5 клеток/лунку и совместно инкубируют с PCSK-9, hIgG1 (Akeso Biopharma, № партии: 20170424) и MAB1 в конечных концентрациях 600 нМ, 50 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно, где клетки предварительно инкубируют с PCSK-9 и антителом перед добавлением соединения для дальнейшей инкубации в течение ночи.

Соответствующий LDL (BODIPY-LDL, Life, каталожный №: L3483; конечная концентрация: 0,001 мг/мл) добавляют в соответствии с дизайном эксперимента, смесь хорошо перемешивают и инкубируют в течение 4 часов;

Клетки собирают, переносят в 96-луночный планшет с заостренным дном и центрифугируют 5 мин при 350хg. Супернатант сливают. Клеточный дебрис ресуспендируют в 200 мкл 1% PBSA и центрифугируют в течение 5 мин при 350хg, затем супернатант сливают. Промывку повторяют один раз. Клеточный дебрис ресуспендируют в 200 мкл 1% PBSA и переносят в пробирку для анализа проточной цитометрией.

Результаты представлены в таблице 5. Взяв в качестве примера LDLR дикого типа, скорость эндоцитоза LDL составляет 11,50%, после добавления PCSK9 скорость эндоцитоза составляет 7,23%, что позволяет предположить, что PCSK9 блокирует эндоцитоз LDL под действием LDLR; когда MAB1 добавляют на основе LDL и PCSK9, скорость эндоцитоза составляет 8,53%, что свидетельствует о том, что MAB1 может эффективно ослаблять PCSK9-опосредованное ингибирование эндоцитоза LDL. Информация о последовательности мутаций в таблицах была получена из литературы и связанных онлайн баз данных (Liang L et al., Scientific Reports, 2015; 5(1):17272.; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Таблица 5. Показатели эндоцитоза % BODIPY-LDL с LDLR дикого типа и различными мутантными LDLR

Сайт мутации	Плазмида	Степень эндоцитоза LDL, %				Ингибирование PCSK9, %
		LDL	LDL+ PCSK9	LDL+PCSK9 9 +hIgG1	LDL+PCSK9 9 + MAB1	
hLDLRFL (дикий тип)	pCDH-hLDLRFL-puro	11,50	7,23	6,27	8,53	37,13
Asp227Glu (hLDLR (D227E))	pCDH- hLDLR(D227E) -puro	11,30	6,72	7,63	11,60	40,53
Glu179Lys	pCDH-hLDLRmt2- puro	9,30	2,04	2,21	7,11	78,06
His583Asp	pCDH-hLDLRmt3- puro	7,56	2,88	2,96	6,06	61,90
Asp172Asn	pCDH-hLDLRmt4.1- puro	11,30	4,71	4,22	10,90	58,32
Leu575Phe	pCDH-hLDLRmt4.2- puro	7,18	5,01	5,08	5,93	30,22
Cys255Arg	pCDH-hLDLRmt6.2- puro	11,90	7,08	6,75	9,77	40,50
Gly636Val	pCDH-hLDLR020- puro	9,79	4,72	4,83	8,24	51,79
Gly98Ser	pCDH-hLDLR059.1- puro	11,60	7,11	7,47	9,96	38,71
Asp94Asn	pCDH-hLDLR0123.1- puro	11,60	3,98	3,34	7,42	65,69
Ala459Thr	pCDH-hLDLR0123.2- puro	9,69	6,74	7,40	8,90	30,44
His583Tyr	pCDH-hLDLR0160- puro	9,04	6,36	6,96	8,17	29,65

Результаты показали, что когда мутантные LDLR обладают активностью в отношении эндоцитоза LDL, и PCSK9 может ингибировать эндоцитоз LDL, добавление MAB1 может значительно увеличить эндоцитоз LDL. То есть MAB1 может эффективно ослаблять опосредованное PCSK9 ингибирование эндоцитоза LDL.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для лечения гиперхолестеринемии.

2. Анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где анти-PCSK9 антитело содержит:

HCDR1: GFTFSSYS (SEQ ID NO: 5);
 HCDR2: ISSSSSYI (SEQ ID NO: 6);
 HCDR3: EYDFWSAYYDAFDV (SEQ ID NO: 7);
 LCDR1: SRNIGGGND (SEQ ID NO: 8);
 LCDR2: GVI (SEQ ID NO: 9); и
 LCDR3: QSFDGSLSGSV (SEQ ID NO: 10).

3. Анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где анти-PCSK9 антитело содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% гомологию, предпочтительно, по меньшей мере, 85% гомологию, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с ней; и

переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, или аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80% гомологию, предпочтительно, по меньшей мере, 85% гомологию, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с ней.

4. Анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело представляет собой моноклональное антитело, предпочтительно, гуманизированное антитело.

5. Фармацевтическая композиция, предпочтительно, для лечения гиперхолестеринемии, содержащая: анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель.

6. Набор, предпочтительно, для лечения гиперхолестеринемии, содержащий анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где набор дополнительно содержит статин (предпочтительно, ингибитор 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы (HMG-CoA), более предпочтительно, выбранный из ловастатина, правастатина, симвастатина, флувастатина, аторвастатина, розувастатина и питавастатина) и/или эзетимиб.

7. Набор по п.6, где анти-PCSK9 антитело находится в форме, подходящей для парентерального или не парентерального пути введения.

8. Способ лечения гиперхолестеринемии, включающий введение (например, парентерально или не парентерально) нуждающемуся субъекту терапевтически эффективного количества анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, где, предпочтительно, субъекту совместно вводят статин, и более

предпочтительно, субъекту совместно вводят статин и эзетимиб.

9. Способ по п.8, где анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, статин и/или эзетимиб вводят одновременно или отдельно.

10. Способ по п.8, где терапевтически эффективное количество составляет 0,1 мг/кг или более, предпочтительно, 0,1-60 мг/кг, в расчете на массу тела пациента.

11. Анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, фармацевтическая композиция по любому из пп.5, набор по любому из пп.6-7 или способ по любому из пп. 8-9, где гиперхолестеринемия выбрана из группы, состоящей из:

(i) гомозиготной семейной гиперхолестеринемии, где, наиболее предпочтительно, гиперхолестеринемия вызвана 1 (парой) или несколькими (парами) мутаций неспаренного аллельного гена в генах LDLR, аполипопротеина В (АpoВ), PCSK9 или адаптерного белка 1 рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLRAP1), предпочтительно, предпочтительно, мутацией аллельного гена, включая дисфункциональную мутацию LDLR, мутацию гена АpoВ, влияющую на связывание LDL с LDLR, функциональную мутацию, приводящую к повышенной аффинности PCSK9 к LDLR, и дисфункциональную мутацию LDLRAP1, приводящую к снижению активности интернализации LDL, и/или, предпочтительно, гиперхолестеринемия (более предпочтительно, HoFH) демонстрирует LDL-C >13 ммоль/л (500 мг/дл) при отсутствии предшествующего лечения, или LDL-C $\geq$ 8 ммоль/л (300 мг/дл) при предшествующем лечении (высокой дозой/максимально переносимой дозой статина в комбинации с эзетимибом), в сочетании с ксантомой кожи или сухожилия в возрасте до 10 лет, или оба родителя являются носителями 1 или более пар мутаций аллельных генов в генах LDLR, АpoВ, PCSK9 или LDLRAP1;

(ii) гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии, где, предпочтительно, гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия вызвана 1 или более непарными аллельными мутациями генов в генах LDLR, аполипопротеина В (АpoВ), PCSK9 или адаптерного белка 1 рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLRAP1), и более предпочтительно, мутация аллельного гена включает дисфункциональную мутацию LDLR, мутацию гена АpoВ, влияющую на связывание LDL с LDLR, функциональную мутацию, приводящую к повышенной аффинности PCSK9 к LDLR, и дисфункциональную мутацию LDLRAP1, приводящую к снижению активности интернализации LDLR; и

(iii) гиперхолестеринемии у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистого заболевания, где, предпочтительно, гиперхолестеринемия у пациента с чрезвычайно высоким или высоким риском сердечно-сосудистого заболевания относится к одновременному удовлетворению следующих условия 1 и условия 2, где условие 1 удовлетворяет любому из а) - h): а) ишемическая болезнь сердца в анамнезе (например, острый коронарный синдром, стабильная ишемическая болезнь сердца, пост-реvascularизация, ишемическая кардиомиопатия), б) ишемический инсульт в анамнезе (кроме лакунарного инфаркта), с) преходящая ишемическая атака, d) периферический атеросклероз (например, атеросклероз сонных артерий, пост-каротидная эндартерэктомия, пост-каротидное стентирование, пост-реvascularизация, атеросклероз нижних

конечностей, пост-реваскуляризация артерий нижних конечностей), е) $\text{LDL-C} \geq 4,9$ ммоль/л (190 мг/дл) или $\text{TC} \geq 7,2$ ммоль/л, f) больные сахарным диабетом 2 типа в возрасте 40 лет и старше с $1,8 \text{ ммоль/л (70 мг/дл)} \leq \text{LDL-C} < 4,9$ ммоль/л (190 мг/дл), g) хроническая болезнь почек в 3 стадии (т.е. при измеренной и рассчитанной скорости клубочковой фильтрации $30 \text{ мл/мин/1,73 м}^2 \leq \text{eGFR} < 60 \text{ мл/мин/1,73 м}^2$), h) по меньшей мере, 3 из следующих факторов риска: мужчины в возрасте ≥ 45 лет и женщины в возрасте ≥ 55 лет; артериальная гипертензия; курение; семейный анамнез CVD (для ближайших родственников: мужчины в возрасте < 55 лет и женщины в возрасте < 65 лет); холестерин HDL < 40 мг/дл; ожирение ($\text{ИМТ} \geq 28 \text{ кг/м}^2$); и условие 2 удовлетворяет либо а), либо б): через 4 недели стабильного базового лечения гиполипидемическим агентом: а) уровень $\text{LDL-C} > 1,8$ ммоль/л (70 мг/дл) для пациентов с чрезвычайно высоким риском или б) уровень $\text{LDL-C} > 2,6$ ммоль/л (100 мг/дл) для пациентов с высоким риском.

12. Способ лечения пациента с гиперхолестеринемией, включающий: (i) генотипирование пациента, (ii) измерение уровня LDL-C в образце (предпочтительно, сыворотке, плазме или цельной крови), взятом у пациента, и (iii) введение пациенту, когда у пациента выявлена гомозиготная (или гетерозиготная) семейная гиперхолестеринемия, терапевтически эффективного количества анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, предпочтительно, в комбинации со статином, более предпочтительно, в комбинации со статином и эзетимибом, где, предпочтительно, терапевтически эффективное количество составляет 0,1 мг/кг или выше, предпочтительно, 0,1-60 мг/кг в расчете на вес пациента.

13. Способ по п.12, где гомозиготная или гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия соответствует определению в п.11.

14. Способ по любому из пп.12-13, где, если у пациента выявлена гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия, пациент имеет уровень LDL-C в сыворотке крови $\geq 4,7$ ммоль/л (180 мг/дл) при отсутствии предшествующего лечения лекарственными средствами, регулирующим липиды, или,

если у пациента идентифицирована гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия, пациент удовлетворяет по крайней мере 1 из следующих а) и б) одновременно: а) пациент с ксантомой кожи или сухожилия или пациент в возрасте < 45 лет с липоидной дугой роговицы, и б) наличие родственника первой степени родства с FH или ранним атеросклеротическим сердечно-сосудистым заболеванием (ASCVD), особенно с ишемической болезнью сердца.

15. Способ по любому из пп.8-12, где анти-PCSK9 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят циклом 2 недели (14 дней) или 4 недели (28 дней) и, предпочтительно, подкожно вводят в первый день (D1) каждого цикла.

16. Применение анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4 при получении фармацевтического состава (или фармацевтической композиции) для снижения риска развития сердечно-сосудистого заболевания и смерти от него у пациента с гиперхолестеринемией с крайне высоким или высоким риском

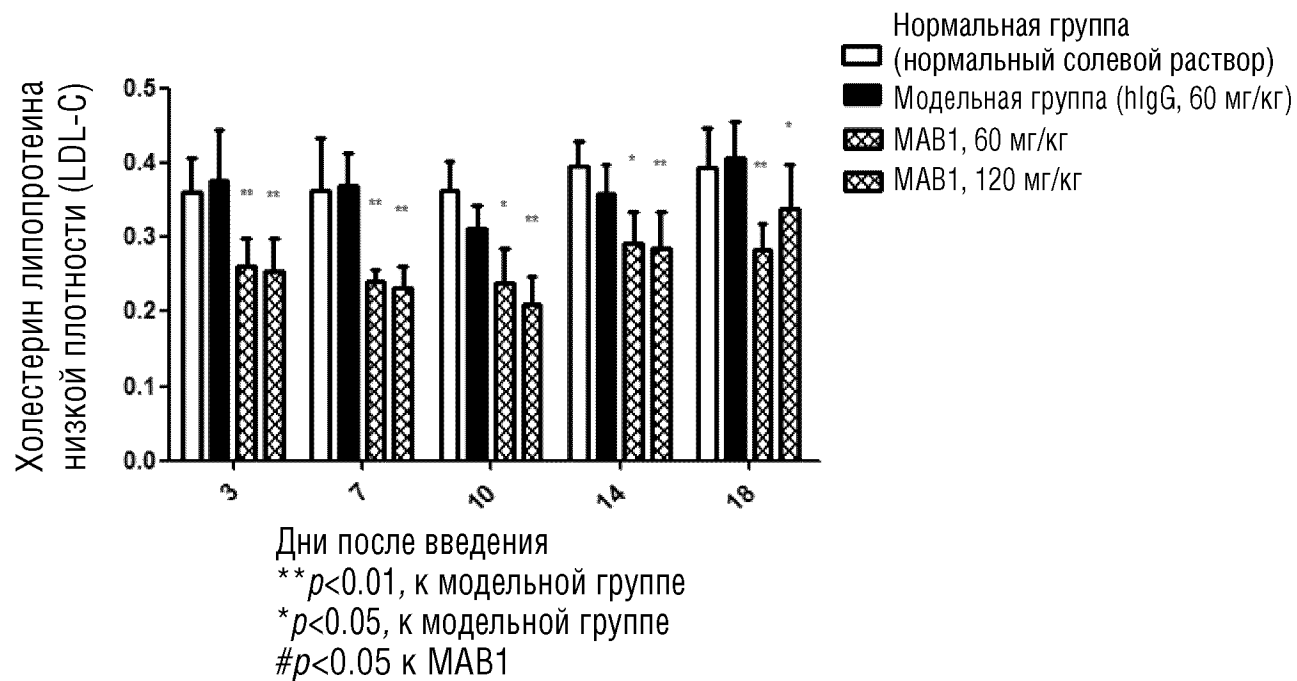
сердечно-сосудистых заболеваний.

17. Способ снижения уровня холестерина в крови у пациента с гиперлипидемическим сердечно-сосудистым заболеванием (более предпочтительно, у пациента с чрезвычайно высоким/высоким риском сердечно-сосудистого заболевания) или снижения риска приступа сердечно-сосудистого заболевания у пациента с гиперлипидемическим сердечно-сосудистым заболеванием, включающий: введение (например, парентерально или не парентерально) пациенту терапевтически эффективного количества анти-PCSK9 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4, предпочтительно, в комбинации со статином, более предпочтительно, в комбинации со статином и эзетимибом, где, более предпочтительно, статин выбран из ловастатина, правастатина, симвастатина, флувастатина, аторвастатина, розувастатина и питавастатина или любой их комбинации.

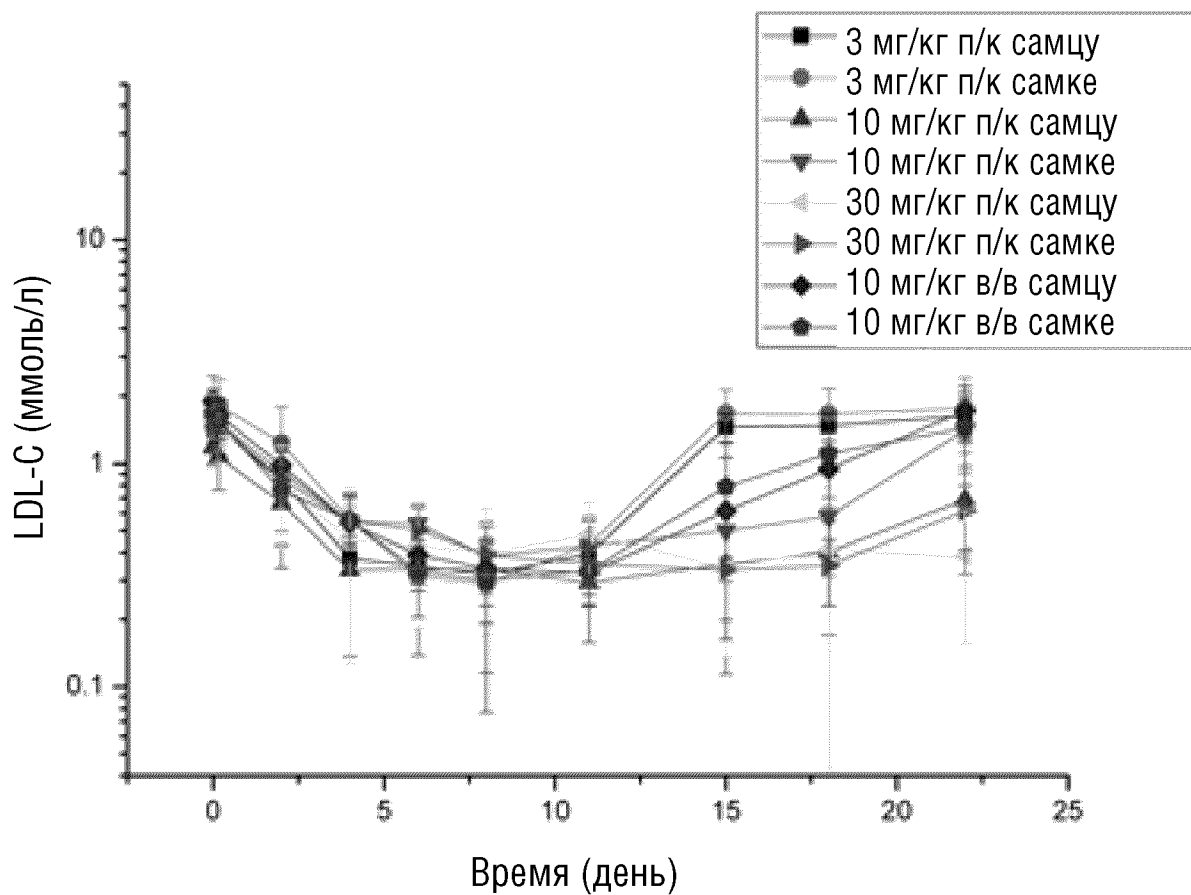
18. Способ по п.17, где анти-PCSK9 антитело вводят в цикле из 2 недель (14 дней) или 4 недель (28 дней) и, предпочтительно, подкожно вводят в первый день (D1) каждого цикла.

По доверенности

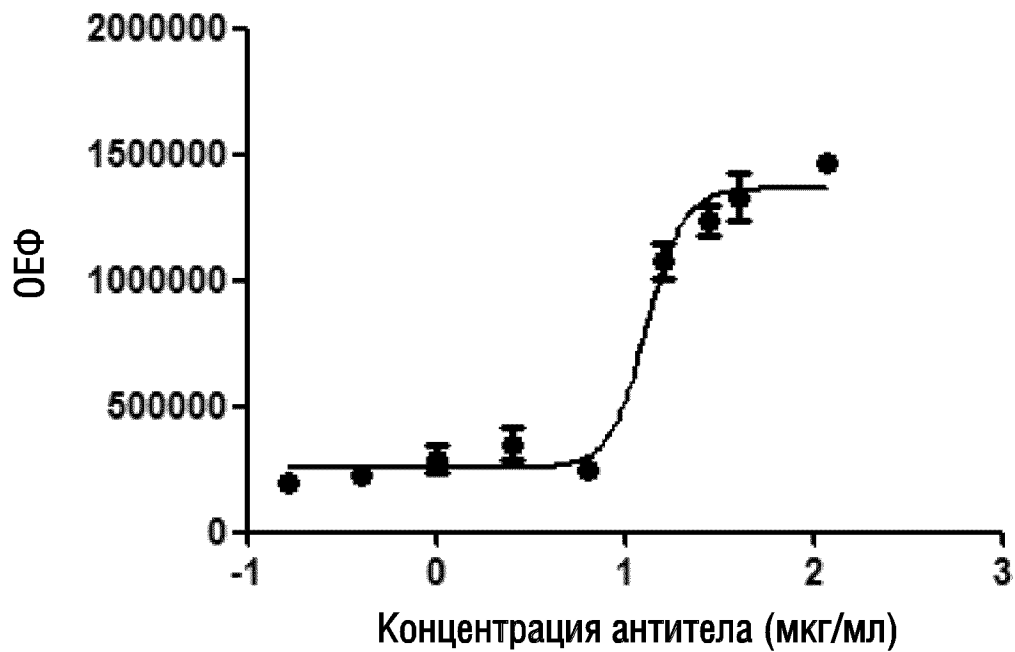
ФИГ.1



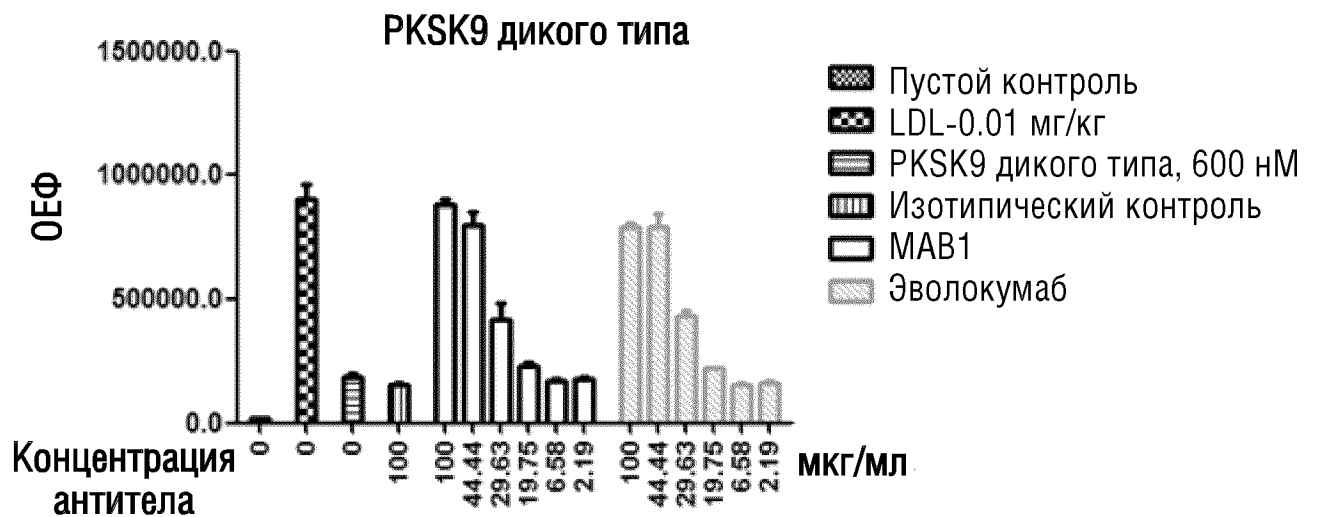
ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4



ФИГ.5

