

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043821**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.27

(21) Номер заявки
201891979

(22) Дата подачи заявки
2017.03.01

(51) Int. Cl. **A61P 9/10** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ ВВЕДЕНИЕМ ИНГИБИТОРА PCSK9 В КОМБИНАЦИИ С ИНГИБИТОРОМ ANGPTL3**

(31) **62/302,907**

(32) **2016.03.03**

(33) **US**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/US2017/020221**

(87) **WO 2017/151783 2017.09.08**

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

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

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

(56) **WO-A1-2012174178**
TIKKA ANNA ET AL.: "The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism", ENDOCRINE, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 52, no. 2, 11 January 2016 (2016-01-11), pages 187-193, XP035952116, ISSN: 1355-008X, DOI: 10.1007/

S12020-015-0838-9 [retrieved on 2016-01-11] page 187, right-hand column, lines 15-20; figure 1

WO-A1-2016011256

WO-A2-2014194168

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 the whole document

RADER DANIEL J.: "New Therapeutic Approaches to the Treatment of Dyslipidemia", CELL METABOLISM, vol. 23, no. 3, 4 February 2015 (2015-02-04), pages 405-412, XP029457099, ISSN: 1550-4131, DOI: 10.1016/J.CMET.2016.01.005 the whole document

Anna Borodovsky ET AL.: "Development of Monthly to Quarterly Subcutaneous Administration of RNAi Therapeutics Targeting the Metabolic Disease Genes PCSK9, ApoC3 and ANGPTL3 ALN-PCS Phase I Study Results", 25 November 2014 (2014-11-25), XP055370914, Retrieved from the Internet: URL: http://www.alnylam.com/web/assets/CardioMetabolic_AHA_Poster_111714.pdf [retrieved on 2017-05-09] the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения пациентов, страдающих гиперхолестеринемией, где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит лечение стандартной липидмодифицирующей терапией. Способы по изобретению обеспечивают снижение по меньшей мере одного показателя липидного обмена у пациента введением терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с пропротеинконвертазой субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в комбинации с терапевтически эффективным количеством антитела, которое специфически связывается с ангиопэтинподобным белком 3 (ANGPTL3). Комбинация анти-PCSK9-антитела с анти-ANGPTL3-антителом пригодна для лечения таких заболеваний как гиперхолестеринемия, включая семейную гиперхолестеринемия (FH), как heFH, так и hoFH, а также гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии и дислипидемии, включая гипертриглицеридемию, хиломикронемия, и для профилактики или лечения заболеваний или расстройств, для которых аномальный липидный обмен является фактором риска, таким как фактор риска развития сердечно-сосудистых заболеваний.

B1**043821****043821 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области терапевтического лечения заболеваний и расстройств, которые ассоциированы с повышенным уровнем липидов и липопротеинов. Более конкретно, изобретение относится к применению ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в комбинации с ингибитором ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3) для лечения пациентов с гиперхолестеринемией и связанными состояниями, которые не отвечают, не достигают адекватного контроля или не переносят лечение стандартной липидмодифицирующей терапией. Уровень техники

Гиперлипидемия является общим термином, который охватывает заболевания и расстройства, характеризующиеся или ассоциированные с повышенным уровнем липидов и/или липопротеинов в крови. Гиперлипидемии включают гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, комбинированную гиперлипидемию и повышенный уровень липопротеина (а) (Lp(a)). Особо распространенной формой гиперлипидемии во многих популяциях является гиперхолестеринемия.

Гиперхолестеринемия, в частности повышение уровней холестерина (LDL-C) липопротеинов низкой плотности (LDL), представляет собой основной риск развития атеросклероза и ишемической болезни сердца (CHD) (Sharrett et al., 2001, *Circulation* 104:1108-1113). Холестерин липопротеинов низкой плотности определен в качестве основной мишени холестеринснижающей терапии и принимается в качестве обоснованной суррогатной терапевтической конечной точки. Результаты многочисленных исследований показали, что

снижение уровня LDL-C приводит к снижению риска развития CHD с наличием выраженной прямой зависимости между уровнями LDL-C и CHD;

снижение LDL-C на каждые 1 ммоль/л (~ 40 мг/дл) уменьшает смертность и заболеваемость сердечно-сосудистыми заболеваниями (CVD) на 22%. Более значимое снижение уровня LDL-C приводит к еще большему сокращению этих событий, и данные сравнения интенсивного против стандартного лечения статинами показывают, что чем ниже уровень LDL-C, тем выше положительный эффект для пациентов с очень высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (CVD).

Семейная гиперхолестеринемия (FH) является наследственным расстройством липидного обмена, которое предрасполагает человека к преждевременному развитию тяжелого сердечно-сосудистого заболевания (CVD) (Kolansky et al. (2008), *Am. J. Cardiology*, 102 (11):1438-1443). FH может быть либо аутосомно-доминантным, либо аутосомно-рецессивным заболеванием, которое возникает в результате мутаций в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) или, по меньшей мере, в трех разных генах, которые кодируют белки, участвующие в печеночном клиренсе LDL-C, могут вызывать FH. Примеры таких дефектов включают мутации в гене, кодирующем рецептор LDL (LDLR), который удаляет LDL-C из системы кровообращения, и в гене аполипопротеина (Apo) B, который является основным белком частицы LDL. В некоторых случаях FH мутация подвергается ген, кодирующий пропротеинконвертазу субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9), фермента, участвующего в деградации LDLR (мутация приобретения функции). Во всех случаях FH характеризуется накоплением LDL-C в плазме с рождения и последующим развитием сухожильных ксантом, ксантелазм, атером и сердечно-сосудистых заболеваний. FH можно разделить на гетерозиготную FH (heFH) или гомозиготную FH (hoFH) в зависимости от того, имеется ли у субъекта генетический дефект в одной (гетерозиготная) или обеих (гомозиготная) копиях вовлеченного гена.

Имеющиеся в настоящее время препараты, снижающие уровень LDL-C, включают статины, ингибиторы всасывания холестерина, фибраты, ниацин и секвестранты желчных кислот. Лечение статинами является обычно назначаемым методом снижения LDL-C. Однако, несмотря на наличие таких видов липидснижающей терапии, многие пациенты с высоким риском не могут достичь рекомендованного им целевого уровня LDL-C (Gitt et al., 2010, *Clin. Res. Cardiol.*, 99 (11):723-733). Пациентам, которые по-прежнему не могут достичь рекомендованного им целевого уровня LDL-C, несмотря на доступную липидмодифицирующую терапию (LMT), иногда назначается механическое удаление липопротеинов аферезом (например, аферезом LDL-C).

Однако пациенты, не достигшие целевого уровня LDL-C, несмотря на получение оптимизированного режима LMT, будут существенно выиграть от альтернативных способов снижения LDL-C или применения комбинации терапевтических агентов, таких как агенты и режимы, описанные здесь.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способам, применениям и композициям для лечения гиперлипидемии у пациентов, которые невосприимчивы к, не достигают адекватного контроля или не переносят лечение стандартной липидмодифицирующей терапией. Терапевтические способы по настоящему изобретению приводят к снижению уровней липопротеинов в сыворотке крови до нормального и приемлемого диапазона и, в силу этого могут снижать риск развития атеросклероза или ишемической болезни сердца.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего гиперхолестеринемией, где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит лечение стандартной липидмодифицирующей терапией, где способ включает лечение пациента комбинацией ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) и ингибитора ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3).

В одном варианте осуществления изобретение относится к введению одной или более доз ингибитора PCSK9 в комбинации с одной или более дозами ингибитора ANGPTL3 пациенту, который лечится или лечился стандартной липидмодифицирующей терапией, но оказался невосприимчивым к такой терапии. Введение комбинации ингибитора PCSK9 с ингибитором ANGPTL3 пациенту приводит к снижению уровня, по меньшей мере, одного липопротеина в сыворотке крови пациента и, следовательно, уменьшает или устраняет необходимость в лечении стандартной липидмодифицирующей терапией пациента.

В связанном аспекте способы по настоящему изобретению включают отбор пациента с гиперхолестеринемией, который лечится или лечился стандартной липидмодифицирующей терапией, и который невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит такую терапию, и введение одной или более доз антитела к PCSK9 в комбинации с одной или более дозами антитела к ANGPTL3 пациенту, тем самым снижая уровень, по меньшей мере, одного липопротеина в сыворотке крови пациента и, следовательно, заменяя применение стандартной липидмодифицирующей терапии комбинированным лечением антителом к PCSK9 плюс антителом к ANGPTL3 для достижения целевого уровня липопротеинов.

Пациенты, которые лечатся или поддаются лечению способами по настоящему изобретению, включают, например, пациентов с гиперхолестеринемией, в том числе, пациентов с семейной гиперхолестеринемией (FH). В некоторых вариантах осуществления пациентами, которые лечатся или поддаются лечению способами по настоящему изобретению, являются пациенты, у которых диагностирована (или о которых известно, что они имеют), гомозиготная FH (hoFH) или гетерозиготная FH (heFH), или пациенты, которые подвергаются риску развития аномально высоких уровней липидов и/или липопротеинов, ассоциированных с гомозиготной FH (hoFH) или гетерозиготной FH (heFH).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3 для применения в лечении пациента, который невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит лечение стандартной липидмодифицирующей терапией, такой как терапия статином. Статин может быть выбран из группы, состоящей из аторвастатина (LIPITOR®), питавастатина (LIVALO®), ловастатина (MEVACOR®), симвастатина (ZOCOR®), правастатина (PRAVACHOL®) флувастатина (LESCOL®) и розувастатина (CRESTOR®). Другие стандартные липидмодифицирующие агенты, которые могут использоваться у пациентов, страдающих гиперхолестеринемией, включают, не ограничиваясь этим, фибраты, ниацин, секвестранты желчных кислот, эзетимиб (ZETIA®), ломитапид (JUZTAPID™), фитостерины, орлистат (XENICAL®).

Иллюстративные ингибиторы PCSK9 или ингибиторы ANGPTL3, которые могут быть использованы в контексте способов по настоящему изобретению, включают, например, анти-PCSK9-антитела или анти-ANGPTL3-антитела, низкомолекулярные ингибиторы и ингибиторы на основе скаффолдов, т.е. PCSK9-связывающие молекулы или ANGPTL3-связывающие молекулы.

В некоторых вариантах осуществления предполагается, что применение комбинации ингибитора PCSK9 с ингибитором ANGPTL3 может быть достаточно эффективным в снижении уровня липидов и/или липопротеинов в сыворотке крови, так что доза стандартной липидмодифицирующей терапии может быть снижена в целях устранения любых неблагоприятных эффектов, или вообще она может быть отменена.

В одном варианте осуществления способы обеспечивают лечение пациента, нуждающегося в этом, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с PCSK9 в комбинации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются, в частности, с ANGPTL3. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 вводят пациенту в дозе примерно 75 мг с частотой один раз в две недели. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 вводят пациенту в дозе примерно 140 мг с частотой один раз в две недели. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 вводят пациенту в дозе примерно 150 мг с частотой один раз в две или четыре недели. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 вводят пациенту в дозе примерно 300 мг с частотой один раз в четыре недели. В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 вводят пациенту в дозе примерно 420 мг с частотой один раз в четыре недели.

В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 выбрано из группы, состоящей из алирокумаба, эволюкумаба, бокоцизумаба, лоделцизумаба и ралпанцизумаба.

В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 представляет собой алирокумаб.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9, содержат определяющие комплементарность участки (CDR) вариативной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR вариативной области легкой цепи (LCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9, содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность

ность SEQ ID NO: 21.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления антитело к PCSK9 вводят пациенту подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту в дозе примерно 150 мг с частотой один раз в неделю. В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту в дозе примерно 300 мг с частотой один раз в неделю. В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту в дозе примерно 450 мг с частотой один раз в неделю. В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту в дозе примерно 300 мг с частотой один раз в две недели. В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту в дозе примерно 450 мг с частотой один раз в две недели. В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту в дозе примерно 20 мг/кг с частотой один раз в четыре недели.

В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 представляет собой эвинакумаб.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ANGPTL3, содержат определяющие комплементарность участки (CDR) вариационной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR вариационной области легкой цепи (LCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ANGPTL3, содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с ANGPTL3, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления введение антитела к PCSK9 в комбинации с антителом к ANGPTL3 приводит к аддитивному эффекту в снижении уровня LDL-C, не-LDL-C и общего холестерина в крови, но не оказывает влияния на уровни HDL-C в крови.

В одном варианте осуществления введение антитела к PCSK9 в комбинации с антителом к ANGPTL3 приводит к синергическому эффекту в снижении уровня LDL-C, не-HDL-C и общего холестерина в крови, но не оказывает влияния на уровни HDL-C в крови.

В одном варианте осуществления введение антитела к PCSK9 в комбинации с антителом к ANGPTL3 приводит к снижению одного или более из следующих показателей:

(a) снижение уровня общего холестерина в сыворотке крови (TC) ;

(b) снижение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови (LDL-C); или

(c) снижение уровня холестерина, не относящегося к липопротеинам высокой плотности в сыворотке крови (не-HDL-C);

где снижение показателей (a), (b) и/или (c) определяется относительно уровня TC в сыворотке крови, уровня LDL-C в сыворотке крови и/или уровня не-HDL-C в сыворотке крови пациента до или на время начала лечения комбинацией ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3.

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

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано влияние H4N1276P и H1N316P на уровни LDL-C у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на сбалансированный рацион и отбирали образцы крови за пять суток до начала эксперимента.

На фиг. 2 показано влияние H4N1276P и H1N316P на уровни общего холестерина у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на сбалансированный рацион и отбирали образцы крови за пять суток до начала эксперимента.

На фиг. 3 показано влияние H4N1276P и H1N316P на уровни HDL-C у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на сбалансированный рацион и отбирали образцы крови за пять суток до начала эксперимента.

На фиг. 4 показано влияние H4N1276P и H1N316P на уровни не-HDL-C у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на сбалансированный рацион и отбирали образцы крови за пять суток до начала эксперимента.

На фиг. 5 показано влияние H4N1276P и H1N316P на уровни LDL-C у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на западный рацион с

высоким содержанием жира в течение 3 недель до начала лечения и поддерживали на этом рационе в течение всего исследования.

На фиг. 6 показано влияние H4H1276P и H1H316P на уровни общего холестерина у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на западный рацион с высоким содержанием жира в течение 3 недель до начала лечения и поддерживали на этом рационе в течение всего исследования.

На фиг. 7 показано влияние H4H1276P и H1H316P на уровни HDL-C у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на западный рацион с высоким содержанием жира в течение 3 недель до начала лечения и поддерживали на этом рационе в течение всего исследования.

На фиг. 8 показано влияние H4H1276P и H1H316P на уровни не-HDL-C у мышей Ldlr-/+ с гиперлипидемией при использовании по отдельности или в комбинации. Мышей помещали на западный рацион с высоким содержанием жира в течение 3 недель до начала лечения и поддерживали на этом рационе в течение всего исследования.

Подробное описание изобретения

Перед тем, как будет описано настоящее изобретение, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Следует также понимать, что терминология, используемая здесь, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

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

Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы в практике настоящего изобретения, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые здесь, включены сюда посредством ссылки в полном объеме.

Способы лечения гиперлипидемии

Настоящее изобретение в общем относится к способам и композициям для снижения уровня липопротеинов у пациентов, страдающих гиперхолестеринемией, которые не отвечают, не достигают адекватного контроля или не переносят стандартную липидмодифицирующую терапию (например, терапию статином). В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение ингибитором PCSK9 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 может служить для снижения уровней липопротеинов у этих пациентов до приемлемого диапазона, тем самым снижая риск развития атеросклероза, инсульта и других сердечно-сосудистых заболеваний. В некоторых вариантах осуществления описанные способы можно использовать для лечения пациентов с гиперхолестеринемией, включая гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (heFH) и/или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (hoFH), в случае, если эти пациенты не отвечают, не достигают адекватного контроля или не переносят стандартную липидмодифицирующую терапию.

Как здесь используется, термин "липопротеин" означает биомолекулярную частицу, содержащую как белок, так и липид. Примеры липопротеинов включают, например, липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL), липопротеин очень низкой плотности (VLDL), липопротеин промежуточной плотности (IDL) и липопротеин (a) (Lp (a)).

Настоящее изобретение, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, включает способы лечения пациентов, которые не отвечают, не достигают адекватного контроля или не переносят стандартную липидмодифицирующую терапию. Как здесь используется, конкретный пациент, который "невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидмодифицирующую терапию", определяет врач, ассистент врача, врач-диагност или другой медицинский специалист на основе уровня одного или более липопротеинов (например, LDL-C и/или не-HDL-C), измеренного или иным образом определенного в сыворотке пациента после лечения стандартным липидмодифицирующим агентом. Врач, ассистент врача, врач-диагност или другой медицинский специалист также могут определить, насколько пациент не переносит стандартную липидмодифицирующую терапию, основываясь на профиле побочных эффектов стандартной липидмодифицирующей терапии, которые может испытывать пациент, включая, не ограничиваясь этим, мышечные боли, болезненность или слабость (миалгию), головную боль, покраснение кожи, проблемы со сном, спазмы в животе, метеоризм, диарею, запор, сыпь, тошноту или рвоту. Пациента, который невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидмодифицирующую терапию, также можно определить или выявить источник влияния других факторов, таких как семейная история пациента, общие сведения о заболевании, теку-

щий статус терапевтического лечения, а также общепринятые или доминирующие липопротеиновые мишени, принятые национальными медицинскими ассоциациями и группами врачей. Например, в определенных случаях, если пациент проходит лечение стандартным липидмодифицирующим агентом и имеет уровень LDL-C выше или равный примерно 70 мг/дл, то это указывает на то, что пациент "невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидмодифицирующую терапию", и лечение с использованием терапевтических способов, описанных здесь, может оказать положительное действие. В других случаях, если пациент проходит терапию стандартным липидмодифицирующим агентом и имеет уровень LDL-C выше или равный примерно 100 мг/дл, то это указывает на то, что пациент "невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидмодифицирующую терапию", и лечение с использованием терапевтических способов, описанных здесь, может оказать положительное действие. В некоторых случаях, если пациент проходит терапию стандартным липидмодифицирующим агентом и имеет уровень LDL-C выше или равный примерно 150 мг/дл, 200 мг/дл, 250 мг/дл, 300 мг/дл, 400 мг/дл или выше, то это указывает на то, что пациент "невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидмодифицирующую терапию", и лечение с использованием терапевтических способов, описанных здесь, может оказать положительное действие. В еще одних случаях, независимо от того, достигнуто или нет определенное процентное снижение уровня LDL-C или не-HDL-C относительно уровня LDL-C или уровня не-HDL-C у пациента в определенной исходной точке ("исходный период"), эти данные можно использовать для определения того, насколько пациент ответил на стандартную липидмодифицирующую терапию или насколько данный пациент нуждается в дальнейшем лечении с использованием способов и агентов по настоящему изобретению. Например, снижение LDL-C или не-HDL-C менее чем на 50% (например, менее чем на 40%, менее чем на 35%, менее чем на 30%, менее чем на 25% и т.д.) от исходного периода может означать необходимость в терапии с использованием способов и агентов по изобретению.

Следовательно, настоящее изобретение включает способы лечения, включающие введение одной или более доз ингибитора PCSK9 в комбинации с одной или более дозами ингибитора ANGPTL3 пациенту, посредством чего уровни общего холестерина, LDL-C и/или не-HDL-C у пациента достоверно снижаются. Например, настоящее изобретение включает терапевтические способы, включающие введение одной или более доз ингибитора PCSK9 и одной или более доз ингибитора ANGPTL3 пациенту, который подвергается стандартной липидмодифицирующей терапии, но невосприимчив к такой терапии или не переносит такую терапию, где после приема одной или более доз ингибитора PCSK9 и одной или более доз ингибитора ANGPTL3 пациент может достичь нормальных уровней общего холестерина, LDL-C или не-HDL-C. В некоторых случаях пациенту может быть отменена стандартная липидмодифицирующая терапия или стандартная липидмодифицирующая терапия может быть продолжена, но может применяться в более низких дозах, и может использоваться в комбинации с ингибитором PCSK9 и ингибитором ANGPTL3, для достижения и/или поддержания определенного целевого уровня липопротеинов. В качестве альтернативы пациенту может быть назначена стандартная липидмодифицирующая терапия в обычной предписанной дозе, но частота введения липидмодифицирующих агентов может быть снижена, если стандартная липидмодифицирующая терапия назначается в сочетании с комбинацией ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3. В некоторых случаях необходимость в лечении стандартной липидмодифицирующей терапией у пациента для достижения и/или поддержания определенного целевого уровня липопротеинов может быть полностью исключена после введения одной или более доз ингибитора PCSK9 в сочетании с ингибитором ANGPTL3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение включает способы уменьшения или исключения необходимости в стандартной липидмодифицирующей терапии, где способы включают отбор пациента с гиперлипидемией (например, с гиперхолестеринемией), который подвергался лечению липидмодифицирующей терапией в течение последнего месяца, последних 2 месяцев, последних 3 месяцев, последних 4 месяцев, последних 5 месяцев, последних 6 месяцев или в течение более длительного периода времени, и введение одной или более доз ингибитора PCSK9 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 пациенту. Способы согласно данному аспекту изобретения приводят к снижению уровня, по меньшей мере, одного липопротеина в сыворотке крови пациента и, следовательно, позволяют уменьшить или исключить необходимость лечения пациента стандартной липидмодифицирующей терапией. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения после введения одной или более доз ингибитора PCSK9 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 уровень LDL-C в сыворотке пациента снижается ниже определенного уровня (например, ниже 100 мг/дл или ниже 70 мг/дл), или уровень общего холестерина снижается до определенного уровня (например, ниже 200 мг/дл или ниже 150 мг/дл).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент, который поддается лечению способами по настоящему изобретению, имеет гиперхолестеринемию (например, концентрация LDL-C в сыворотке крови выше или равна 70 мг/дл, или концентрация LDL-C в сыворотке крови выше или равна 100 мг/дл). В некоторых вариантах осуществления гиперхолестеринемия пациента неадекватно контролируется стандартной липидмодифицирующей терапией, например, терапией статином. Например, настоящее изобретение включает способы лечения пациента, который невосприимчив к, не достигает адек-

ватного контроля или не переносит лечение стандартной липидмодифицирующей терапией, такой как терапия статином, или имеет гиперхолестеринемию, которая неадекватно контролируется ежедневным приемом дозы выбранного статина, выбранного из группы, состоящей из аторвастатина (включая аторвастатин+эзетимиб), розувастатина, церивастатина, питавастатина, флувастатина, ловастатина, симвастатина (включая симвастатин+эзетимиб), правастатина и их комбинаций. Настоящее изобретение также включает способы снижения уровня холестерина, LDL-C или не-LDL-C у пациента с гиперхолестеринемией, и у которого проявляется непереносимость статинов или у которого в противном случае развивается побочная или нежелательная реакция(и) на терапию статинами (например, скелетно-мышечные боли, головная боль, слабость или спазмы (например, миалгия, миопатия, рабдомиолиз и т.д.).

Отбор пациентов

Настоящее изобретение включает способы и композиции, пригодные для лечения пациентов, страдающих гиперлипидемией, которые не отвечают, не достигают адекватного контроля или не переносят лечение стандартной липидмодифицирующей терапией. Пациенты, которые поддаются лечению способами по настоящему изобретению, могут также иметь один или более дополнительных критериев отбора. Например, пациент может быть отобран для лечения способами по настоящему изобретению, если у пациента диагностировано или выявлено наличие риска развития гиперхолестеринемического состояния, например, такого как гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (heFH), гомозиготная семейная гиперхолестеринемия (hoFH), аутомно-доминантная гиперхолестеринемия (ADH, например ADH, связанная с одной или несколькими мутациями приобретения функции в гене PCSK9), аутомно-рецессивная гиперхолестеринемия (ARH, например ARH, связанная с мутациями в LDLRAP1), а также случаи гиперхолестеринемии, отличной от семейной гиперхолестеринемии (nonFH). Диагностика семейной гиперхолестеринемии (например, heFH или hoFH) может быть проведена с помощью генотипирования и/или клинических критериев. Для пациентов, которые не были генотипированы, клинический диагноз может основываться на критериях Саймона Брума или на критериях для определения FH, или на критериях ВОЗ/голландской сети клиник для лечения липидных нарушений с суммой баллов >8.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент может быть отобран на основании наличия истории ишемического заболевания сердца (CHD). Как здесь используется, термин "история CHD" (или "зарегистрированная история CHD") включает одно или более из:

- (i) остро инфаркта миокарда (MI);
- (ii) бессимптомного ИМ;
- (iii) нестабильной стенокардии;
- (iv) процедуры реваскуляризации коронарных артерий (например, чрескожное коронарное вмешательство [PCI] или операции шунтирования коронарной артерии [CABG]); и/или
- (v) клинически значимой CHD, диагностированной инвазивным или неинвазивным методом обследования (например, коронарной ангиографией, стресс-тестом с использованием беговой дорожки, стресс-эхокардиографией или методами ядерной визуализации).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент может быть отобран на основе наличия сердечно-сосудистого заболевания, отличного от ишемической болезни сердца ("не-CHD-CVD"). Как здесь используется, термин "не-CHD-CVD" включает одно или более из:

- (i) зарегистрированного предшествующего ишемического инсульта с очаговым ишемическим неврологическим дефицитом, который сохраняется более 24 ч, как полагается атеротромботического происхождения;
- (ii) заболевания периферических артерий;
- (iii) аневризмы брюшной аорты;
- (iv) атеросклеротического стеноза почечных артерий; и/или
- (v) заболевания сонной артерии (транзиторные ишемические атаки или >50% окклюзия сонной артерии).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент может быть отобран на основе наличия одного или более дополнительных факторов риска, например, таких как (i) зарегистрированная хроническая болезнь почек средней тяжести (CKD), которая определена по показателю $30 \leq \text{eGFR} < 60$ мл/мин/1,73 м² в течение 3 месяцев или более; (ii) сахарный диабет 1 типа или 2 типа с или без повреждения органов-мишеней (например, ретинопатия, нефропатия, микроальбуминурия); (iii) рассчитанный риск фатального исхода в результате CVD в течение ближайших 10 лет SCORE \geq 5% (ESC/EAS Guidelines for management of dyslipidemias, Conroy et al., 2003, Eur. Heart J. 24:987-1003).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент может быть отобран на основе наличия одного или более 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), привычек в плане физических упражнений (например, регулярное занятие физическими упражнениями, нерегулярное занятие физическими упражнениями), других ранее имевшихся болезненных состояний (например, диабет 2 типа, высокое кровяное давление и т.д.) и текущего статуса лечения (например, в настоящее время принимает бета-блокаторы, ниацин, эзетимиб, фибраты, омега-3

жирные кислоты, желчные кислоты и т.д.).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъект, который поддается лечению способами по изобретению, имеет повышенный уровень одного или более маркеров воспаления. Любой маркер системного воспаления может быть использован для целей настоящего изобретения. Подходящие маркеры воспаления включают, не ограничиваясь этим, С-реактивный белок, цитокины (например, IL-6, IL-8 и/или IL-17) и молекулы клеточной адгезии (например, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, LFA-2, VCAM-1, NCAM и PECAM).

В соответствии с настоящим изобретением пациенты могут быть отобраны на основе комбинации одного или более вышеуказанных критериев отбора или терапевтических характеристик. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент, подходящий для лечения способами по настоящему изобретению, также может отобран на основе наличия heFH или не-FH в комбинации с: (i) историей зарегистрированной CHD; (ii) историей сердечно-сосудистого заболевания, отличного от CHD, и/или (iii) сахарным диабетом с поражением органов-мишеней; такие пациенты также могут быть отобраны на основе концентрации LDL-C в сыворотке крови, превышающей или равной 70 мг/дл.

В соответствии с некоторыми другими вариантами осуществления пациент, подходящий для лечения способами по настоящему изобретению, помимо гиперхолестеринемии, которая не контролируется адекватно терапевтическим режимом приема статинов в ежедневной умеренной дозе, также может отобран на основе наличия heFH или не-FH без CHD или сердечно-сосудистого заболевания, отличного от CVD, но который имеет (i) рассчитанный риск фатального исхода в результате CVD в течение ближайших 10 лет SCORE \geq 5%; или (ii) сахарный диабет без повреждения органов-мишеней; такие пациенты также могут быть отобраны на основе концентрации LDL-C в сыворотке крови, превышающей или равной 100 мг/дл.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъект, который поддается лечению способами по изобретению, является субъектом, у которого имеется синдром семейной хиломикронемии (FCS, также известный как недостаточность липопротеинлипазы).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъект, который поддается лечению способами по изобретению, является субъектом, который подвергается или недавно подвергался аферезу липопротеинов (например, в течение последних шести 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 PCSK9 плюс ингибитора ANGPTL3 в качестве дополнительной терапии

Настоящее изобретение включает способы лечения, где пациенту, который подвергается или недавно подвергался стандартной липидмодифицирующей терапии (например, терапии статином), вводят ингибитор PCSK9 плюс ингибитор ANGPTL3 в соответствии с определенным количеством и частотой дозирования, и где ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3 вводят пациенту в дополнение к ранее проводимой липидмодифицирующей терапии (если это применимо), то есть в качестве дополнения к ранее проводимому терапевтическому режиму ежедневного введения статинов.

Например, способы по настоящему изобретению включают дополнительные терапевтические режимы, где ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3 вводят в качестве дополнительной терапии к аналогичному неизменяемому терапевтическому режиму ежедневного введения статинов (т. е., к аналогичной дозировке статина), на котором пациент находился до приема ингибиторов PCSK9 и ANGPTL3. В еще одних вариантах осуществления ингибиторы PCSK9 и ANGPTL3 вводят в качестве дополнительной терапии к терапевтическому режиму введения статинов, включающему статин в количестве, которое больше или меньше дозы статина, на которой пациент находился до приема ингибиторов PCSK9 и ANGPTL3. Например, после начала терапевтического режима, включающего ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3, которые вводятся при определенной частоте и дозировке, суточная доза статина, вводимая или назначенная пациенту, может (a) оставаться без изменения, (b) повыситься или (c) снизиться (например, титрация с повышением дозы или снижением дозы) по сравнению с суточной дозой статинов, которую пациент принимал до начала терапевтического режима с ингибиторами PCSK9 и ANGPTL3, в зависимости от терапевтических потребностей пациента.

Терапевтическая эффективность

Способы по настоящему изобретению могут приводить к снижению уровней в сыворотке крови одного или более липидных компонентов, выбранных из группы, состоящей из уровня общего холестерина, LDL-C, не-HDL-C, ApoB100, VLDL-C, триглицеридов, Lp (a) и остаточного холестерина. Например, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения введение ингибитора PCSK9 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 подходящему субъекту приведет к среднему процентному снижению в сыворотке крови по сравнению с исходным уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL-C), по меньшей мере, примерно на 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более; среднему процентному снижению по сравнению с исходным уровнем ApoB100, по меньшей мере, примерно на 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или более; среднему процентному снижению по сравнению с исходным уровнем не-HDL-C, 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 по сравнению с исходным уровнем VLDL-C, по меньшей мере, примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или более; среднему процентному снижению по сравнению с исходным уровнем триглицеридов, по меньшей мере, примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или более; и/или среднему процентному снижению по сравнению с исходным уровнем Lp (a), по меньшей мере, примерно на 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или более.

Ингибиторы PCSK9 и ингибиторы ANGPTL3

Способы по настоящему изобретению включают введение пациенту терапевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3.

Ингибиторы PCSK9

Как здесь используется, термин "ингибитор PCSK9" представляет собой любой агент, который связывается с человеческой PCSK9 или взаимодействует с ней и ингибирует нормальную биологическую функцию PCSK9 *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры групп ингибиторов PCSK9 включают низкомолекулярные антагонисты PCSK9, ингибиторы на основе нуклеиновых кислот экспрессии или активности PCSK9 (например, siPHK или антисмысловые молекулы), молекулы на основе пептидов, которые специфически взаимодействуют с PCSK9 (например, пептиды), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с PCSK9, белки, содержащие лиганд-связывающий фрагмент рецептора LDL, PCSK9-связывающие скаффолды (например, дарпины, белки с HEAT-повторами, белки с ARM-повторами, белки с тетратрипептидными повторами, скаффолд-конструкции на основе фибронектина и другие скаффолды на основе встречающихся в природе белковых повторов и т.д. [см., например, Voersma и Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22: 849-857 и ссылки, приведенные там]), и аптамеры или их фрагменты против PCSK9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ингибиторы PCSK9, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, представляют собой анти-PCSK9-антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связываются с человеческим PCSK9.

Как здесь используется, термин "человеческая пропротеинконвертаза субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9)" или "человеческая PCSK9" или "hPCSK9", относится к PCSK9, имеющей последовательность нуклеиновой кислоты, показанную в SEQ ID NO: 22, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, или ее биологически активный фрагмент.

Ингибиторы ANGPTL3

Как здесь используется, термин "ингибитор ANGPTL3" представляет собой любой агент, который связывается с ANGPTL3 человека или взаимодействует с ним, и ингибирует нормальную биологическую функцию ANGPTL3 *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры групп ингибиторов ANGPTL3 включают низкомолекулярные антагонисты ANGPTL3, ингибиторы на основе нуклеиновых кислот экспрессии или активности ANGPTL3 (например, siPHK или антисмысловые молекулы), молекулы на основе пептидов, которые специфически взаимодействуют с ANGPTL3 (например, пептиды), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с ANGPTL3, ANGPTL3-связывающие скаффолды (например, дарпины, белки с HEAT-повторами, белки с ARM-повторами, белки с тетратрипептидными повторами, скаффолд-конструкции на основе фибронектина и другие скаффолды на основе встречающихся в природе белковых повторов и т.д. [см. например, Voersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22: 849-857 и ссылки, цитируемые там]) и аптамеры или их фрагменты против ANGPTL3. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы ANGPTL3, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, представляют собой анти-ANGPTL3-антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфически связываются с человеческим ANGPTL3.

Как здесь используется, термин "ангиопоэтинподобный белок-3 человека" или "человеческий ANGPTL3" или "hANGPTL3" относится к ANGPTL3, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (см. также последовательность под инвентарным номером в NCBI NP 055310), или его биологически активный фрагмент.

Как здесь используется, термин "антитело" предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями, а также их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе HCVR или V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе LCVR или V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (C_{L1}). Области V_H и V_L могут дополнительно подразделяться на участки гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность участками (CDR), между которыми находятся более консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая область V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR анти-PCSK9-антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть

модифицированы естественным путем или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

Как здесь используется, термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Как здесь используется, термины "антигенсвязывающий участок" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., включают любой встречающийся в природе, полученный ферментативно, синтетический или полученный методами генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные области антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фазовые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и обработать химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для расположения одной или более вариабельных и/или константных областей в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают:

- (i) Fab-фрагменты;
- (ii) F(ab')₂-фрагменты;
- (iii) Fd-фрагменты;
- (iv) Fv-фрагменты;
- (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv);
- (vi) dAb-фрагменты и

(vii) минимальные элементы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельный участок антитела (например, выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), такой как пептид CDR3)) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4.

В используемое в настоящем описании выражение "антигенсвязывающий фрагмент" также включаются другие сконструированные генной инженерией молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с пересажеными CDR, диатела, триатела, тетратела и минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, как здесь используется.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит, по меньшей мере, одну вариабельную область. Вариабельная область может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит, по меньшей мере, один CDR, который находится смежно или в рамке считывания с одной или более последовательностями каркасной области. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих область V_H, связанную с областью V_L, области V_H и V_L могут находиться относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерную область V_H или V_L.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать, по меньшей мере, одну вариабельную область, ковалентно связанную, по меньшей мере, с одной константной областью. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных областей, которые могут быть найдены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации вариабельных и константных областей, включая любую из вышеприведенных иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные области могут быть связаны непосредственно друг с другом или могут быть связаны посредством полной или неполной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять, по меньшей мере, из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к обеспечению гибкой или полугибкой связи между смежными вариабельными и/или константными областями в одном полипептиде. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может включать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных областей, указанных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одной или более мономерными областями V_H или V_L (например, дисульфидной связью(ми)).

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

Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать, по меньшей мере, две разных вариабельных области, где каждая вариабельная область способна специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене. Любой формат полиспе-

цифических антител, включая описанные здесь иллюстративные форматы биспецифических антител, может быть адаптирован для применения 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, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

Как здесь используется, 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, введенные случайным или сайтоспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако как здесь используется, термин "человеческое антитело" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были перенесены на последовательности каркасной области человека. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные в организме млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Данный термин не предназначен для включения антител, выделенных или продуцированных в организме человека-субъекта.

Как здесь используется, термин "рекомбинантное человеческое антитело" предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяин (описанные ниже), антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител (описанные ниже), антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res., 20: 6287-6295), или антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены 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, подвергаются соматическому мутагенезу *in vivo*) и, следовательно, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, будучи производными и связанными с последовательностями V_H и V_L зародышевой линии человека, могут отсутствовать в природе в репертуаре зародышевой линии человека *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию с молекулярной массой примерно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепочечной дисульфидной связью. Во второй форме димеры не связаны посредством межцепочечных дисульфидных связей, и образуется молекула с молекулярной массой примерно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (половинное антитело). Данные формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, но не ограничивается этим, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Замена одной аминокислоты в шарнирной области IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology, 30: 105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнирной области IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области, C_H2 или C_H3 , которая могут быть желательными, например, в производстве для повышения выхода желаемой формы антитела.

Как здесь используется, термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и выделено и/или отделено, по меньшей мере, от одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было выделено или отделено, по меньшей мере, от одного компонента организма или ткани или клетки, в которых антитело естественным образом существует или естественным образом продуцируется, является "выделенным антителом" для целей настоящего изобретения. 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 по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "специфически связывается" или тому подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно устойчив в физиологических условиях. Способы определения того, насколько специфично связывается антитело с антигеном, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плаз-

монный резонанс и тому подобное. Например, антитело, которое "специфически связывается" с PCSK9 или которое "специфически связывается" с ANGPTL3, как используется в контексте настоящего изобретения, включает антитела, которые связываются с PCSK9 или ANGPTL3, или их фрагменты, с K_D ниже примерно 1000 нМ, ниже примерно 500 нМ, ниже примерно 300 нМ, ниже примерно 200 нМ, ниже примерно 100 нМ, ниже примерно 90 нМ, ниже примерно 80 нМ, ниже примерно 70 нМ, ниже примерно 60 нМ, ниже примерно 50 нМ, ниже примерно 40 нМ, ниже примерно 30 нМ, ниже примерно 20 нМ, ниже примерно 10 нМ, ниже примерно 5 нМ, ниже примерно 4 нМ, ниже примерно 3 нМ, ниже чем примерно 2 нМ, ниже примерно 1 нМ или ниже примерно 0,5 нМ, как измерено в методом поверхностного плазмонного резонанса. Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с человеческой PCSK9 или человеческим ANGPTL3, обладает перекрестной реактивностью по отношению к другим антигенам, таким как молекулы PCSK9 или молекулы ANGPTL3 от других видов (отличных от человека).

Анти-PCSK9-антитело и анти-ANGPTL3-антитело, пригодные для способов по настоящему изобретению, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области и/или участках CDR переменных областей тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых происходят антитела. Такие мутации могут быть легко установлены сравнением аминокислотных последовательностей, описанных здесь, с последовательностями зародышевой линии, имеющимися, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает способы, включающие применение антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых здесь, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или участках CDR были мутированы в соответствующий остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело, или в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или подвергнуты консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в совокупности обозначаются здесь как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменной области тяжелой и легкой цепей, описанных здесь, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркасной области и/или участков CDR в областях V_H и/или V_L подвергаются обратной мутации в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. В еще одних вариантах осуществления только определенные остатки подвергаются обратной мутации в исходную последовательность 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 еще одних вариантах осуществления один или более остатков каркасной области и/или участков CDR мутируют в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально происходит антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасной области и/или участках CDR, например, где определенные отдельные остатки мутируют в соответствующий остаток определенной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или подвергаются мутации в соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко тестировать на одно или более желательных свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), пониженная иммуногенность и т.д. Применение антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных данным общим способом, охватывается настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает способы, включающие применение анти-PCSK9-антитела и анти-ANGPTL3-антитела, содержащих варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных здесь, с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает применение анти-PCSK9-антитела и анти-ANGPTL3-антитела, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых здесь.

Как здесь используется, термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет анализировать взаимодействия в режиме реального времени путем детектирования изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences division GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Как здесь используется, термин " K_D " предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком антигена в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образован пространственно расположенными рядом аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анти-PCSK9-антитело и анти-ANGPTL3-антитело, используемые в способах по настоящему изобретению, представляют антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания. Как здесь используется, выражение "pH-зависимые характеристики связывания" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляют "пониженное связывание с PCSK9 при кислом значении pH по сравнению с нейтральным pH" (для целей настоящего описания оба выражения могут использоваться взаимозаменяемо) или что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют "пониженное связывание с ANGPTL3 при кислом значении pH по сравнению с нейтральным pH" (для целей настоящего описания оба выражения могут использоваться взаимозаменяемо). Например, антитела с "pH-зависимыми характеристиками связывания" включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PCSK9 или с ANGPTL3 с более высокой аффинностью при нейтральном значении pH, чем при кислом pH. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с PCSK9 или ANGPTL3, по меньшей мере, в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более раз с более высокой аффинностью при нейтральном значении pH, чем при кислом значении pH.

В соответствии с этим аспектом изобретения анти-PCSK9-антитело и анти-ANGPTL3-антитело с "pH-зависимыми характеристиками связывания" могут обладать одним или более аминокислотными изменениями относительно исходного анти-PCSK9-антитела или исходного анти-ANGPTL3-антитела. Например, анти-PCSK9-антитело или анти-ANGPTL3-антитело с pH-зависимыми характеристиками связывания могут содержать одну или более гистидиновых замен или вставок, например, в одном или более CDR исходного анти-PCSK9-антитела или исходного анти-ANGPTL3-антитела. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения обеспечиваются способы, включающие введение анти-PCSK9-антитела и анти-ANGPTL3-антитела, которые содержат аминокислотные последовательности CDR (например, CDR тяжелой и легкой цепи), которые идентичны аминокислотным последовательностям CDR исходного анти-PCSK9-антитела или исходного анти-ANGPTL3-антитела, за исключением замены одной или более аминокислот одного или более CDR исходного антитела остатком гистидина. Анти-PCSK9-антитела или анти-ANGPTL3-антитела с pH-зависимым связыванием могут содержать, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более гистидиновых замен внутри одного CDR или распределенных в многочисленных (например, 2, 3, 4, 5 или 6) CDR исходного анти-PCSK9-антитела или исходного анти-ANGPTL3-антитела. Например, настоящее изобретение включает применение анти-PCSK9-антител и анти-ANGPTL3-антител с pH-зависимым связыванием, включающих одну или более гистидиновых замен в HCDR1, одну или более гистидиновых замен в HCDR2, одну или более гистидиновых замен в HCDR3, одну или более гистидиновых замен в LCDR1, одну или более гистидиновых замен в LCDR2 и/или одну или более гистидиновых замен в LCDR3 исходного анти-PCSK9-антитела или исходного анти-ANGPTL3-антитела.

Как здесь используется, выражение "кислое значение pH" означает значение pH, составляющее 6,0 или ниже (например, ниже примерно 6,0, ниже примерно 5,5, ниже примерно 5,0 и т.д.). Выражение "кислое значение pH" включает значения pH примерно 6,0, 5,95, 5,90, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или ниже. Как здесь используется, термин "нейтральное значение pH" означает pH примерно от 7,0 до примерно 7,4. Выражение "нейтральное значение pH" включает значения pH примерно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Неограничивающие примеры анти-PCSK9-антител, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, например, алирокумаб, эволокумаб, бокоцизумаб, лоделцизумаб, ралпанцизумаб или антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеуказанных антител.

Неограничивающий пример анти-ANGPTL3-антитела, которое можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает эвинакумаб.

Получение человеческих антител

Анти-PCSK9-антитела и анти-ANGPTL3-антитела можно получить в соответствии с любым способом получения/выделения антител, известным в данной области. Например, антитела для применения в способах по настоящему изобретению могут быть получены гибридомными технологиями, фаговым дисплеем, дрожжевым дисплеем и т.д. Антитела для применения в способах по настоящему изобретению могут представлять, например, химерные антитела, гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела.

В данной области известны способы получения человеческих антител в организме трансгенных мышей. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с PCSK9 или ANGPTL3.

Например, с использованием технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патент США № 6594541, Regeneron Pharmaceuticals) или любого другого известного способа получения моноклональных антител, первоначально выделяют высокоаффинные химерные антитела к PCSK9 или ANGPTL3 с варибельной областью человека и константной областью мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий варибельные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее варибельную область человека и константную область мыши в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируется в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь VELOCIMMUNE® подвергают стимуляции представляющим интерес антигеном и выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки) у мышей, которые экспрессируют антитела. Лимфатические клетки могут быть слиты с клетками миеломной линии для получения иммортальных гибридомных клеточных линий, и такие гибридомные клеточные линии подвергают и отбирают для идентификации гибридомных клеточных линий, которые продуцируют антитела, специфичные к интересующему антигену. ДНК, кодирующую варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделить и связать с желательными изотипическими константными областями тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть получен в клетке, такой как клетка СНО. Альтернативно, ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или варибельные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие варибельную область человека и константную область мыши. Антитела характеризуют и отбирают на желательные характеристики, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д., используя стандартные процедуры, известные специалистам в данной области. Константные области мыши заменяют требуемой константной областью человека с получением полностью человеческого антитела по изобретению, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного. Несмотря на то, что выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичность связывания мишени находятся в варибельной области.

В общем, антитела, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, обладают высокой аффинностью, как описано выше, при измерении связыванием с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе или в фазе раствора. Мышиные константные области заменяют требуемыми человеческими константными областями с получением полностью человеческих антител по изобретению. Несмотря на то, что выбранная константная область может варьировать в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичность связывания мишени находятся в варибельной области.

Конкретные примеры человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, которые специфически связываются с PCSK9, которые можно использовать 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 варибельной области тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), включающие SEQ ID NO: 12/17.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат определяющие комплементарность участки тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 15, 18, 19 и 21.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Конкретные примеры человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, которые специфически связываются с ANGPTL3, которые можно использовать 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 варибельной области тяжелой и легкой цепи (HCVR/LCVR), включающие SEQ ID NO: 2/3.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат определяющие комплементарность участки тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-

HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Фармацевтически композиции и способы введения

Настоящее изобретение включает способы, которые включают введение ингибитора PCSK9 пациенту в комбинации с ингибитором ANGPTL3, где ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3 содержатся в одной и той же или в разных фармацевтических композициях. Фармацевтические композиции по изобретению составлены с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, которые обеспечивают подходящий транспорт, доставку, переносимость и тому подобное. Многочисленные подходящие составы можно найти в справочнике, известном всем химикам, работающим в области фармации: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и эмульсии вода-в-масле, эмульсии на основе карбоваска (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбоваск. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Примеры фармацевтических составов, содержащих анти-PCSK9-антитела и/или анти-ANGPTL3-антитела, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают любой из составов, приведенных в патенте США № 8795669 (в котором описаны, среди прочего, примерные составы, содержащие алирокумаб) или в WO2013/166448, или WO 2012/168491.

Известны и могут быть использованы различные системы доставки для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецепторно-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol., Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают, не ограничиваясь этим, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, всасыванием через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и ее можно вводить вместе с другими биологически активными агентами.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно с помощью обычной иглы или шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, то для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению легко применимо устройство в виде шприца-ручки. Такое устройство в виде шприца-ручки может представлять собой устройство многоразового или одноразового использования. В устройстве в виде шприца-ручки для многоразового использования, как правило, применяется заменяемая кассета, которая содержит фармацевтическую композицию. После введения всей фармацевтической композиции в кассете и опустошения кассеты, пустую кассету можно без труда извлечь и заменить новой кассетой, которая содержит фармацевтическую композицию. Затем устройство в виде шприца-ручки можно использовать повторно. В одноразовом устройстве в виде шприца-ручки отсутствует заменяемая кассета. Однако одноразовое устройство в виде шприца-ручки выпускается предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре в устройстве. После опустошения резервуара с фармацевтической композицией все устройство выбрасывается.

Многочисленные системы доставки в виде шприца-ручки или автоинъектора многоразового использования применимы для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, не ограничиваясь этим, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых устройств для доставки в виде шприца-ручки, имеющие применения при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь этим, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, LP) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), и это лишь некоторые из них.

В некоторых ситуациях фармацевтическая композиция может доставляться в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления может быть использован насос (см. Langer,

см. Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed, стр. 14: 201). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы; см. "Medical Applications of Controlled Release", Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть расположена вблизи мишени композиции, в результате требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 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 можно приготовить, например, растворением, суспендированием или эмульгированием антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций имеются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты, и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт гидрогенизированное касторовое масло/полиоксиэтилен (50 моль)) и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Инъекционный препарат, полученный таким образом, предпочтительно разливают в соответствующие ампулы.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в разовой лекарственной форме, обеспечивающей дозу активных ингредиентов. Такие дозированные формы в разовой лекарственной форме включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д.

Дозировка

Количество ингибитора PCSK9 (например, анти-PCSK9-антитела) или ингибитора ANGPTL3 (например, анти-ANGPTL3-антитела), вводимое субъекту в соответствии со способами по настоящему изобретению, обычно представляет собой терапевтически эффективное количество. Как здесь используется, выражение "терапевтически эффективное количество ингибитора PCSK9" означает дозу ингибитора PCSK9 при введении в комбинации с ингибитором ANGPTL3, приводящую 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 по сравнению с исходным периодом) одного или более показателей, выбранных из группы, состоящей из общего холестерина, LDL-C, ApoB100, не-HDL-C, VLDL-C, триглицеридов, Lp (a) и остаточного холестерина, или количество, которое уменьшает или устраняет потребность пациента в других терапевтических вмешательствах, таких как аферез липопротеинов, или которое снижает нормализованный для пациента уровень афереза.

В случае анти-PCSK9-антитела терапевтически эффективное количество может составлять примерно от 0,05 до примерно 600 мг, например, примерно 0,05 мг, примерно 0,1 мг, примерно 1,0 мг, примерно 1,5 мг, примерно 2,0 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 анти-PCSK9-антитела. Согласно некоторым примерным вариантам осуществления настоящего изобретения терапевтически эффективное количество анти-PCSK9-антитела составляет 75 мг, 150 мг или 300 мг (например, в случае алирокумаба) или 140 мг или 420 мг (например, в случае эволокумаба). Другие дозировки ингибиторов PCSK9 будут очевидны специалистам в данной области техники, и они рассматриваются в рамках настоящего изобретения.

Количество анти-PCSK9-антитела, содержащееся в отдельных дозах, может быть выражено в единицах миллиграмм антитела на килограмм массы тела пациента (т.е., мг/кг). Например, анти-PCSK9-антитела можно вводить пациенту в дозе примерно от 0,0001 до примерно 10 мг/кг массы тела пациента.

Количество ингибитора ANGPTL3 (например, анти-ANGPTL3-антитела), вводимое субъекту в соответствии со способами по настоящему изобретению, обычно представляет терапевтически эффективное количество. Как здесь используется, термин "терапевтически эффективное количество ингибитора ANGPTL3" означает дозу ингибитора ANGPTL3, в комбинации с ингибитором PCSK9, приводящую 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 по сравнению с исходным периодом) одного или более показателей, выбранных из группы, состоящей из общего холестерина, LDL-C, ApoB100, не-HDL-C, VLDL-C, триглицеридов, Lp (a) и остаточного холестерина, или количество, которое предупреждает или ослабляет атеросклероз у субъекта (как описано здесь в других местах).

В случае анти-ANGPTL3-антитела терапевтически эффективное количество может составлять примерно от 0,05 до примерно 600 мг, например, примерно 0,05 мг, примерно 0,1 мг, примерно 1,0 мг, примерно 1,5 мг, примерно 2,0 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 анти-ANGPTL3-антитела. Другие дозировки ингибиторов ANGPTL3 будут очевидны для специалистов в данной области техники, и они рассматриваются в объеме настоящего изобретения.

Количество анти-ANGPTL3-антитела, содержащееся в отдельных дозах, может быть выражено в единицах миллиграмм антитела на килограмм массы тела пациента (т.е., мг/кг). Например, анти-ANGPTL3-антитело можно вводить пациенту в дозе примерно от 0,0001 до примерно 10 мг/кг массы тела пациента.

Комбинированное лечение

Как описано здесь в других местах, способы по настоящему изобретению могут включать введение ингибитора PCSK9 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 пациенту, который невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидснижающую терапию. В некоторых вариантах осуществления необходимость в дальнейшем введении липидснижающей терапии, может быть полностью исключена. В некоторых вариантах осуществления комбинированное применение ингибитора PCSK9 с ингибитором ANGPTL3 можно использовать в сочетании с ("вдобавок") ранее назначенной пациенту липидснижающей терапией. Например, в контексте снижения, по меньшей мере, одного показателя обмена липидов/липопротеинов у пациента, страдающего гиперлипидемией (например, гиперхолестеринемией), где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля или не переносит стандартную липидснижающую терапию, комбинацию ингибитора PCSK9 с ингибитором ANGPTL3 можно вводить пациенту в сочетании с неизменяемым терапевтическим режимом ежедневного введения статинов. Иллюстративные терапевтические режимы ежедневного введения статинов, с которыми можно вводить ингибитор PCSK9 плюс ингибитор ANGPTL3 в контексте настоящего изобретения, включают, например, аторвастатин (10, 20, 40 или 80 мг каждый день) (аторвастатин/эзетимиб 10/10 или 40/10 мг каждый день), розувастатин (5, 10 или 20 мг каждый день), церивастатин (0,4 или 0,8 мг каждый день), питавастатин (1, 2 или 4 мг каждый день), флувастатин (20, 40 или 80 мг каждый день), симвастатин (5, 10, 20, 40 или 80 мг каждый день), симвастатин/эзетимиб (10/10, 20/10, 40/10 или 80/10 мг каждый день), ловастатин (10, 20, 40 или 80 мг каждый день), правастатин (10, 20, 40 или 80 мг каждый день) и их комбинации. Другие липидмодифицирующие терапевтические режимы, с которыми можно вводить ингибитор PCSK9 плюс ингибитор ANGPTL3 в контексте настоящего изобретения, включают, например, (1) агент, который ингибирует поглощение холестерина и/или повторное всасывание желчных кислот (например, эзетимиб); (2) агент, который усиливает катаболизм липопротеинов (такой как ниацин); и/или (3) активаторы транскрипционного фактора LXR, который играет роль в элиминации холестерина, такого как 22-гидроксихолестерин.

Неограничивающие примеры анти-PCSK9-антител, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, например, алирокумаб, эволокумаб, бокоцизумаб, лоделцизумаб, ралпанцизумаб или антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеуказанных антител.

Неограничивающий пример анти-ANGPTL3-антитела, для применения в контексте настоящего изобретения, включает эвинакумаб.

Режимы введения

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения субъекту можно вводить множество доз ингибитора PCSK9 (например, фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор PCSK9) и ингибитора ANGPTL3 (т.е. фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор ANGPTL3) в течение определенного периода времени (например, в дополнение к терапевтическому режиму ежедневного введения статинов или другой фоновой липидмодифицирующей терапии). Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту многочисленных доз ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3. Как здесь используется, термин "последовательное введение" означает, что каждая доза ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3 вводится субъекту

екту на разную временную точку, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной начальной дозы ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3, с последующим введением одной или более вторичных доз ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3, и необязательно с последующим введением одной или более третичных доз ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения отдельных доз фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PCSK9 и ингибитор ANGPTL3. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которая вводится в начале режима лечения (также называемая "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют дозы, которые вводятся после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют дозы, которые вводятся после вторичных доз. Начальные, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3, но обычно могут отличаться друг от друга по частоте введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3, содержащееся в начальных, вторичных и/или третичных дозах, различается друг от друга (например, оно может корректироваться в сторону повышения или снижения по мере необходимости) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале режима лечения в качестве "нагрузочных доз" с последующими дозами, которые вводятся менее часто (например, "поддерживающие дозы").

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения каждая вторичная и/или третичная доза вводится от 1 до 26 (например, 1, 1, 2, 2, 3, 3, 4, 4, 5, 5, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Как здесь используется, выражение "непосредственно предшествующая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту до введения непосредственно 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 PCSK9 и ингибитора ANGPTL3. Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, 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 многочисленные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту от 1 до 2, 4, 6, 8 или более недель непосредственно после предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих многочисленные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту от 1 до 2, 4, 6, 8 или более недель непосредственно после предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой вводят пациенту вторичные и/или третичные дозы, может изменяться в течение курса лечения. В ходе лечения врач также корректирует частоту введения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

Примеры

Следующие примеры приводятся для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание способов получения и применения способов и композиций по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что заявители рассматривают в качестве изобретения. Были предприняты попытки гарантировать точность используемых чисел (например, количества, температура, и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия и давление является атмосферным или близким к атмосферному давлению.

Пример 1. Получение человеческих антител к человеческой PCSK9.

Человеческие анти-PCSK9-антитела получали, как описано в патенте США № 8062640. Иллюстративный ингибитор PCSK9, используемый в следующем примере, представляет собой человеческое анти-PCSK9-антитело, обозначенное как "H1H316P", также известное как "алирокумаб" или "PRAULENT®". H1H316P имеет следующие характеристики аминокислотной последовательности: тяжелая цепь, содержащая SEQ ID NO: 16, и легкая цепь, содержащая SEQ ID NO: 20; варибельная область тяжелой цепи (HCVR), содержащая SEQ ID NO: 12, и варибельная область легкой цепи (LCVR), содержащая SEQ ID NO: 17; определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащий SEQ ID NO: 13, HCDR2, содержащий SEQ ID NO: 14, HCDR3, содержащий SEQ ID NO: 15, определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LCDR1), содержащий SEQ ID NO: 18, LCDR2, содержащий SEQ ID

NO: 19 и Lcdr3, содержащий SEQ ID NO: 21.

Пример 2. Получение человеческих антител к человеческому ANGPTL3.

Человеческие анти-ANGPTL3-антитела получали, как описано в патенте США № 9018356. Иллюстративный ингибитор ANGPTL3, используемый в следующем примере, представляет собой человеческое анти-ANGPTL3-антитело, обозначенное как "H4H276S", также известное как "эвинакумаб". H4H276S имеет следующие характеристики аминокислотной последовательности: тяжелая цепь, содержащая SEQ ID NO: 10, и легкая цепь, содержащая SEQ ID NO: 11; переменная область тяжелой цепи (HCVR), содержащая SEQ ID NO: 2, и переменная область легкой цепи (LCVR), содержащая SEQ ID NO: 3; определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащий SEQ ID NO: 4, HCDR2, содержащий SEQ ID NO: 5, HCDR3, содержащий SEQ ID NO: 6, определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (LCDR1), содержащий SEQ ID NO: 7, LCDR2, содержащий SEQ ID NO: 8 и LCDR3, содержащий SEQ ID NO: 9.

Пример 3. Влияние лечения *in vivo* комбинацией анти-hANGPTL3-антитела и анти-PCSK9-антитела на уровни циркулирующих в крови липидов у мышей *Ldlr*^{-/+} с гиперлипидемией.

Влияние одного анти-hANGPTL3-антитела H4H1276 (эвинакумаб), одного анти-PCSK9-антитела H1H316P (алирокумаб) и обоих антител в комбинации на уровни липидов в сыворотке крови определяли на мышах *LDLR*^{-/+}. Эти мыши имеют гиперлипидемию в основном с циркулирующим в крови холестерином, находящемся в форме LDL, за счет частичной недостаточности *LDLR*, основного рецептора поглощения LDL-C.

В первом исследовании у мышей-самцов линии *LDLR*^{-/+}, находящихся на сбалансированном рационе, предварительно отбирали образцы крови за 5 суток до начала эксперимента, и мышам распределяли на группы по 5 мышей в каждой. Антитела H4H1276P, H1H316P, их комбинацию и совпадающий по изотипу контроль (hIgG4) с нерелевантной специфичностью в каждом случае вводили в дозе 10 мг/кг подкожной инъекцией на сутки 0 опыта. У мышам отбирали образцы крови после 4 ч голодания на последовательные дни после введения антител и определяли уровни липидов в сыворотке крови (общий холестерин, LDL-C, не-HDL-C и HDL-C) на биохимическом анализаторе ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Рассчитывали средние значения для каждой группы на каждую временную точку. Результаты, выраженные в виде среднего значения \pm SEM, концентрации липидов в сыворотке, приведены на фиг. 1, 2, 3 и 4.

Во втором опыте мышам-самцов *LDLR*^{-/+} помещали на западный рацион с высоким содержанием жира в течение 3 недель до инъекции антител, и мышам скармливали этот рацион в течение всего периода исследования. Остальную часть опыта проводили по протоколу, аналогичному описанному для первого опыта. Результаты, выраженные в виде среднего значения \pm SEM, концентрации липидов в сыворотке, приведены на фиг. 5, 6, 7 и 8.

Уровни циркулирующих в крови антител (сывороточные Ab) в обоих опытах определяли с использованием стандартного анализа ELISA. Вкратце, планшеты покрывали козьим античеловеческим Fc антителом (Sigma-Aldrich) для захвата сывороточных Ab. Затем в планшеты добавляли сыворотку, и захваченные антитела детектировали хемилюминесценцией с использованием козьего антитела против человеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Sigma-Aldrich). Результаты, выраженные в виде среднего значения \pm SEM, показаны в таблицах 1A и 1B (первый опыт) и в таблицах 2A и 2B (второй опыт). Контроль: мышам, получавшие совпадающее по изотипу контрольное Ab.

Обобщение результатов

Введение комбинации H1H316P и H4H1276P в виде однократных подкожных доз мышам *LDLR*^{-/+}, находившихся на сбалансированном рационе и западном рационе с высоким содержанием жира приводило к достоверному снижению общего холестерина, LDL-C и не-HDL-C и оказывало аддитивный эффект на уровни липидов в сыворотке крови по сравнению с соответствующим отдельным введением каждого антитела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента, страдающего гиперхолестеринемией, где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля посредством или не переносит лечение статинами, фибратами, ниацином, секвестрантами желчных кислот, эзетимибом, лomitapiдом, фитостеринами или орлистатом, где способ включает лечение пациента комбинацией ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) и ингибитора ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3), где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с PCSK9, и ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, причем анти-PCSK9-антитело выбрано из группы, состоящей из алирокумаба, эволокумаба, бокоцизумаба, лоделцизумаба и ралпанцизумаба, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, содержит определяющие комплементарность участки (CDR) переменной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR переменной области легкой цепи (LCVR) с по-

следовательностью SEQ ID NO: 3.

2. Способ по п.1, где гиперхолестеринемия представляет гетерозиготную семейную гиперхолестеринемия (HeFH) или гомозиготную семейную гиперхолестеринемия (HoFH).

3. Способ по п.1, где анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 75 мг с частотой один раз в две недели.

4. Способ по п.1, где анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 140 мг с частотой один раз в две недели.

5. Способ по п.1, где анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 150 мг с частотой один раз в две недели или один раз в четыре недели.

6. Способ по п.1, где анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 300 мг с частотой один раз в четыре недели.

7. Способ по п.1, где анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 420 мг с частотой один раз в четыре недели.

8. Способ по любому из пп.1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9, содержат определяющие комплементарность участки (CDR) вариационной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR вариационной области легкой цепи (LCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 17.

9. Способ по любому из пп.1-8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9, содержат CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

10. Способ по любому из пп.1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PCSK9, содержат HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

11. Способ по любому из пп.1-10, где анти-PCSK9-антитело представляет собой алирокумаб.

12. Способ по п.1, где анти-PCSK9-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту подкожно или внутривенно.

13. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 150 мг с частотой один раз в неделю.

14. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 300 мг с частотой один раз в неделю.

15. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 450 мг с частотой один раз в неделю.

16. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 300 мг с частотой один раз в две недели.

17. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 450 мг с частотой один раз в две недели.

18. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в дозе примерно 20 мг/кг с частотой один раз в четыре недели.

19. Способ по любому из пп.1-18, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

20. Способ по любому из пп.1-19, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

21. Способ по любому из пп.1-20, где анти-ANGPTL3-антитело представляет собой эвинакумаб.

22. Способ по п.1, где анти-ANGPTL3-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту подкожно или внутривенно.

23. Способ по любому из пп.1-22, где комбинация ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3 выполнена с возможностью снижения одного или более из следующих показателей:

(а) снижение уровня общего холестерина в сыворотке крови (ТС);

(б) снижение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови (LDL-C);
или

(с) снижение уровня холестерина, не относящегося к липопротеинам высокой плотности в сыворотке крови (не-HDL-C);

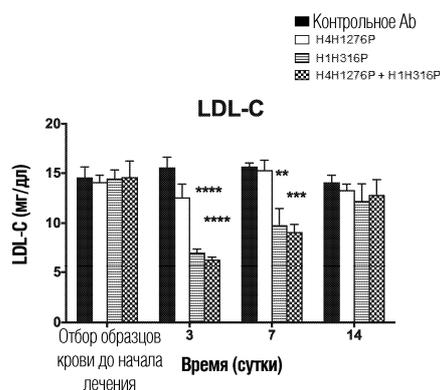
где снижение показателей (а), (б) и/или (с) определяется относительно уровня ТС в сыворотке кро-

ви, уровня LDL-C в сыворотке крови и/или уровня не-HDL-C в сыворотке крови пациента до или на время начала лечения комбинацией ингибитора PCSK9 и ингибитора ANGPTL3.

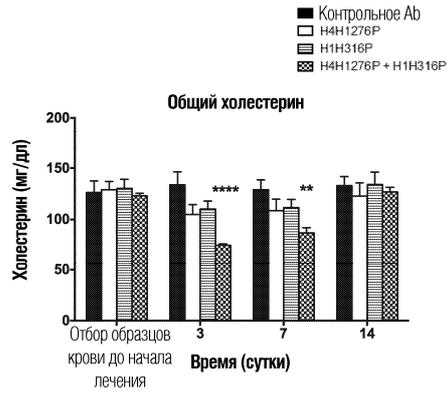
24. Применение ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в комбинации с ингибитором ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3) в лечении пациента, страдающего гиперхолестеринемией, где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля посредством или не переносит лечение статином, фибратами, ниацином, секвестрантами желчных кислот, эзетимибом, ломитапидом, фитостеринами или орлистатом, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с PCSK9, и ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, причем анти-PCSK9-антитело выбрано из группы, состоящей из алирокумаба, эволокумаба, бокоцизумаба, лоделцизумаба и ралпанцизумаба, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, содержит определяющие комплементарность участки (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 3.

25. Применение ингибитора пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в комбинации с ингибитором ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3) в получении лекарственного средства для лечения пациента, страдающего гиперхолестеринемией, где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля посредством или не переносит лечение статином, фибратами, ниацином, секвестрантами желчных кислот, эзетимибом, ломитапидом, фитостеринами или орлистатом, где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с PCSK9, и ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, причем анти-PCSK9-антитело выбрано из группы, состоящей из алирокумаба, эволокумаба, бокоцизумаба, лоделцизумаба и ралпанцизумаба, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, содержит определяющие комплементарность участки (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 3.

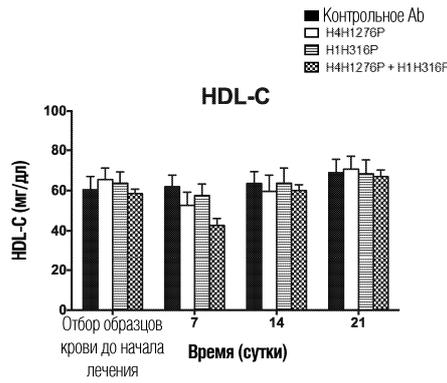
26. Фармацевтическая композиция для лечения пациента, страдающего гиперхолестеринемией, где пациент невосприимчив к, не достигает адекватного контроля посредством или не переносит лечение статином, фибратами, ниацином, секвестрантами желчных кислот, эзетимибом, ломитапидом, фитостеринами или орлистатом, где композиция содержит ингибитор пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 9 (PCSK9) в комбинации с ингибитором ангиопоэтинподобного белка 3 (ANGPTL3), где ингибитор PCSK9 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с PCSK9, и ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, причем анти-PCSK9-антитело выбрано из группы, состоящей из алирокумаба, эволокумаба, бокоцизумаба, лоделцизумаба и ралпанцизумаба, и причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающиеся с ANGPTL3, содержит определяющие комплементарность участки (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 3.



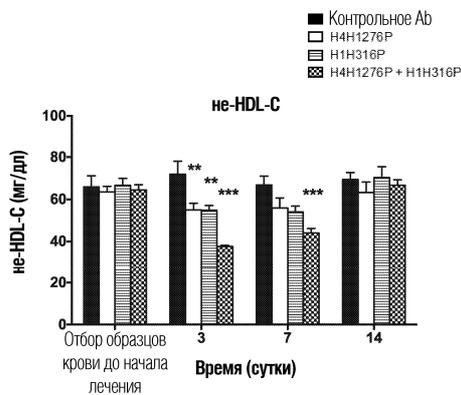
Фиг. 1



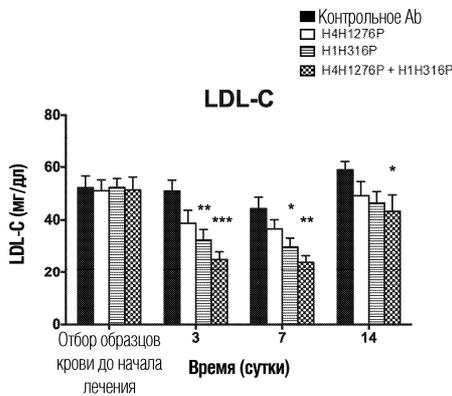
Фиг. 2



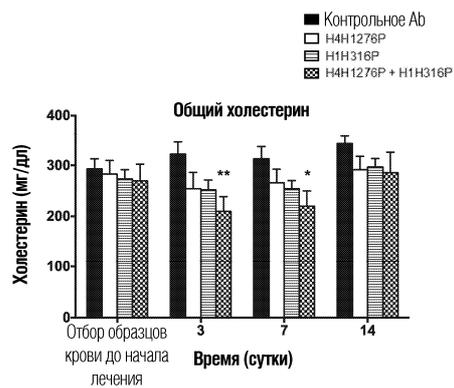
Фиг. 3



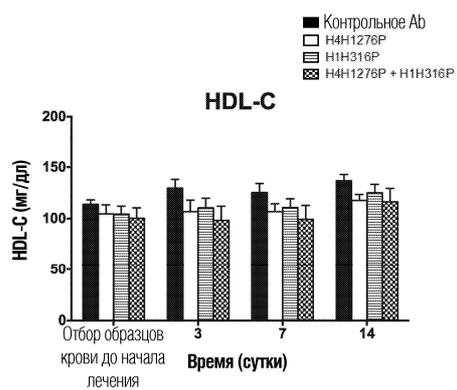
Фиг. 4



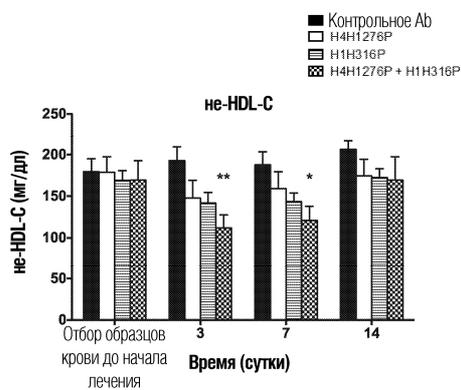
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

