

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044927**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.12

(51) Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)
C12N 9/64 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092778

(22) Дата подачи заявки
2019.05.16

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ PCSK9-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/672,187**

(32) **2018.05.16**

(33) **US**

(43) **2021.05.27**

(86) **PCT/US2019/032710**

(87) **WO 2019/222529 2019.11.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛИБ ТЕРАПЬЮТИКС, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
**Митчелл Трэйси С. (US), Мили
Ричард (умер)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,
Джермакян Р.В., Парамонова К.В.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(56) US-A1-20160159883
WO-A1-2015143156
WO-A1-2015143199
US-A1-20130302399
WO-A1-2014140210

(57) В настоящем изобретении обеспечены фармацевтические композиции, содержащие белки на основе фибронектина с каркасными доменами, которые связывают, например, пропротеинконвертазу субтилизин/кексин-9 (PCSK9).

044927

B1

044927
B1

Родственные заявки

В данной заявке испрашиваются преимущества и приоритет предварительной заявки США № 62/672187, поданной 16 мая 2018 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее раскрытие относится к белкам на основе фибронектина с каркасными доменами, которые связывают пропротеинконвертазу субтилизин/кексин-9 (PCSK9), а также к их фармацевтическим композициям и способам применения.

Предпосылки создания изобретения

Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) представляет собой фермент, кодируемый геном PCSK9 у человека на хромосоме 1. PCSK9 связывается с рецептором частиц липопротеинов низкой плотности (LDL). Рецептор LDL (LDLR) на мембранах клеток печени и других клеток связывается и инициирует эндоцитоз LDL-частиц из внеклеточной жидкости в клетки, таким образом снижая концентрацию циркулирующих частиц LDL. Если PCSK9 блокирован, большее количество LDL рециркулирует и присутствует на поверхности клеток для удаления частиц LDL из внеклеточной жидкости. Следовательно, блокирование PCSK9 может снизить концентрации частиц LDL в крови.

Ингибиторы PCSK9, моноклональные антитела алирокумаб и эволокумаб, были одобрены в виде подкожных инъекций или инфузий раз в две недели или раз в месяц для снижения концентраций частиц LDL, когда статины и другие лекарственные средства были недостаточно эффективными или плохо переносились. Для инъекций раз в месяц требуется несколько миллилитров лекарственного средства для достижения желаемой дозы. Несмотря на то, что составы, имеющие более высокую концентрацию активного агента, могут обеспечить более желательные режимы и объемы дозирования, этому препятствуют ограничения, связанные с растворимостью, повышенной вязкостью и нестабильностью биологических препаратов, включая склонность к агрегации и образованию частиц. Carpenter JF, et al., Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: Gaps that may compromise product quality. Journal of Pharmaceutical Sciences Vol. 98, Issue 4 (2008).

Необходимы фармацевтические композиции, нацеленные на PCSK9 и обладающие потенциалом для более желательных режимов дозирования, меньших объемов и/или повышения эффективности, при этом сохраняя в целом безопасный и хорошо переносимый профиль.

Сущность изобретения

Настоящее раскрытие обеспечивает композиции, содержащие каркасные белки на основе фибронектина, которые с высоким сродством связывают пропротеинконвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), и которые могут быть стабильно составлены в высоких концентрациях для максимального биологического эффекта и более удобных режимов дозирования, объемов дозирования и удобных для пациента устройств доставки. PCSK9-связывающий слитый белок содержит PCSK9-связывающий мотив и аминокислотную последовательность человеческого сывороточного альбумина (HSA). PCSK9-связывающий мотив и аминокислотная последовательность HSA могут быть экспрессированы в виде генетического слияния или конъюгированы химическим путем.

PCSK9-связывающий мотив, описанный в настоящем документе, основан на аднектине, семействе белков, происходящих из 10-го домена фибронектина человека III типа (10Fn3), созданном для связывания с высоким сродством с мишенью. В соответствии с данным раскрытием, PCSK9-связывающий слитый белок стабильно составлен в высоких концентрациях, чтобы обеспечить максимальную биологическую активность, а также удобные режимы и объемы дозирования. Концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет по меньшей мере 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет по меньшей мере около 200 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет по меньшей мере около 250 мг/мл или по меньшей мере около 275 мг/мл, или по меньшей мере около 300 мг/мл, или по меньшей мере около 350 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления PCSK9-связывающий слитый белок вводят в стандартной дозе от около 275 мг до около 325 мг (например, около 300 мг).

PCSK9-связывающий мотив содержит или состоит из аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 1) или ее варианта, как описано в настоящем документе. PCSK9-связывающий мотив связывается с человеческим PCSK9 с суб-наномолярной аффинностью зависимым от концентрации образом. PCSK9-связывающий мотив имеет химическую конъюгацию или слияние на С-конце с аминокислотной последовательностью человеческого сывороточного альбумина (HSA). В различных вариантах осуществления PCSK9-связывающий мотив имеет слияние аминокислотной последовательности HSA на С-конце и может содержать связывающую последовательность аминокислот между PCSK9-связывающим мотивом и аминокислотной последовательностью HSA.

PCSK9-связывающий слитый белок может быть стабильно составлен в форме раствора при высокой концентрации. Состав не проявляет существенной деградации или образования частиц при обычных условиях длительного хранения и краткосрочного хранения в ускоренных и стрессовых условиях. Иллюстративные составы содержат или состоят в основном из (в дополнение к активному агенту, как описано):

L-гистидин, L-гистидина моногидрохлорид, хлорид натрия и необязательно полисорбат-80.

Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию могут быть удобно представлены в формах стандартных доз, содержащих предварительно определенное количество активного агента по раскрытию на дозу. В некоторых вариантах осуществления стандартные дозы составляют не более чем около 1,5 мл по объему или не более чем около 1 мл по объему. В некоторых вариантах осуществления стандартные дозы составляют не более чем 0,8 мл по объему или не более чем 0,7 мл по объему. В еще других вариантах осуществления композицию вводят в виде микродозы, например, в объеме менее чем 0,5 мл, или менее чем около 0,25 мл, или менее чем около 0,15 мл. В различных вариантах осуществления композиция доставляется в стандартной дозе, содержащей от около 20 до около 450 мг PCSK9-связывающего слитого белка. Например, в некоторых вариантах осуществления дозу от 20 до около 75 мг вводят в виде еженедельной микродозы (например, в объеме менее чем около 0,25 мл или менее чем около 0,15 мл). В других вариантах осуществления дозу от около 200 до около 450 мг вводят примерно каждые две недели, раз в месяц или раз в два месяца в объеме в диапазоне примерно 0,7-1,5 мл.

Композиция или состав подходит для введения подкожным, внутримышечным, внутрикожным или внутривенным путем. Высокая концентрация состава позволяет использовать менее частые режимы дозирования и меньшие объемы дозирования, подходящие для подкожного введения. Как показано в настоящем документе, максимальное подавление PCSK9 достигается при относительно низкой концентрации PCSK9-связывающего слитого белка, и более высокие концентрации обеспечивают возможность увеличить продолжительность подавления. В некоторых вариантах осуществления субъект получает стандартную дозу композиции примерно раз в неделю, раз в 2 недели или примерно раз в 3 недели, или примерно раз в 4 недели (например, примерно раз в месяц), или примерно раз в 6 недель или примерно раз в 8 недель (примерно раз в 2 месяца).

В некоторых вариантах осуществления субъект получает микродозу композиции, такую как объем от около 50 до около 250 мкл, примерно каждую неделю или примерно каждые две недели.

Композицию можно вводить для лечения нарушения, связанного с PCSK9, у субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления пациент нуждается в снижении LDL (например, LDL-C). В некоторых вариантах осуществления субъект может демонстрировать заболевание, связанное с холестерином, такое как гиперхолестеринемия и/или атеросклероз. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется семейная гиперхолестеринемия. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или находится в группе высокого риска сердечно-сосудистого заболевания (например, атеросклеротической ишемической болезни сердца).

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят вместе с терапией статинами или другой пероральной гиполипидемической терапией, или в некоторых вариантах осуществления композицию применяют в качестве монотерапии гиперхолестеринемии, то есть без пероральной гиполипидемической терапии (например, терапии статинами).

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 иллюстрирует структуру PCSK9-связывающего слитого белка.

Фиг. 2A иллюстрирует фармакокинетическую и фармакодинамическую модель (PK-PD) PCSK9 у нечеловеческих приматов (NHP) и человека. LIB-003 относится к PCSK9-связывающему слитому белку.

Фиг. 2B иллюстрирует модель Gadkar для предсказания эффекта нацеливания PCSK9 на LDLC. Gadkar K et al., A Mechanistic Systems Pharmacology Model for Prediction of LDL Cholesterol Lowering by PCSK9 Antagonism in Human Dyslipidemic Populations, CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. 2014; 3(11).

Подробное описание изобретения

Настоящее раскрытие обеспечивает композиции, содержащие каркасные слитые белки на основе фибронектина, которые связывают пропротеинконвертазу субтилизин/кексин-9 (PCSK9) с высоким сродством, и которые могут быть стабильно составлены при высокой концентрации для максимального биологического эффекта и более удобных режимов и объемов дозирования, а также доставки с использованием удобных для пациента устройств доставки, таких как шприц или автоинъектор. PCSK9-связывающий слитый белок содержит PCSK9-связывающий мотив и аминокислотную последовательность, кодирующую человеческий сывороточный альбумин (HSA) на С-конце.

Пропропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 9 представляет собой циркулирующий белок, секретируемый главным образом печенью, который играет важную роль в рециркуляции печеночных LDLR, и был идентифицирован в качестве утвержденной мишени лекарственного средства для снижения LDL-C. LDLR является основным путем для выведения LDL-холестерина (LDL-C) из кровотока. PCSK9 в плазме связывается с печеночным LDLR, а также с LDL-C, который нацеливает рецептор на эндоцитоз и деградацию, тем самым снижая возможность LDLR выводить LDL-C из кровотока. Путем ингибирования связывания PCSK9 с LDLR предотвращается деградация LDLR, увеличивается рециркуляция LDLR, усиливается клиренс LDL-C и снижаются уровни циркулирующего LDL-C.

PCSK9-связывающий мотив, описанный в настоящем документе, основан на "аднектине", семействе белков, происходящих из 10-го домена фибронектина человека типа III, сконструированных для высокоаффинного связывания с мишенью. "Аднектины" представляют собой небольшие (≤ 12 кДа) компактные

белки без гомологии последовательности с иммуноглобулинами, но обладающие β -листной структурой сворачивания с разнообразными петлями, аналогичными вариациям областям антитела. Аднектины не содержат дисульфидов и не являются гликозилированными, обладают высокой термической стабильностью и мономерным поведением в растворе, и эффективно продуцируются с использованием систем экспрессии для бактерий, дрожжей или млекопитающих. Путем модификации последовательности и длины вариационной петли при сохранении практически постоянных остатков каркаса может быть достигнута суб-наномолярная аффинность связывания с мишенью при сохранении структурной стабильности. Учитывая их размер, аднектины быстро фильтруются почками и, следовательно, требуют модификации для усиления фармакокинетики (ПК) для применений *in vivo*. Типичные PCSK9-связывающие мотивы (аднектины) раскрыты в патентах США 8420098; 9234027; и 9856309, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

В соответствии с данным раскрытием, PCSK9-связывающий слитый белок стабильно составляют при высокой концентрации, чтобы обеспечить максимальную биологическую активность, а также удобные режимы и объемы дозирования. Концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет по меньшей мере 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет по меньшей мере около 150 мг/мл или в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 175 мг/мл, или по меньшей мере около 200 мг/мл, или по меньшей мере около 225 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет по меньшей мере около 250 мг/мл или по меньшей мере около 275 мг/мл, или по меньшей мере около 300 мг/мл, или по меньшей мере около 350 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет от около 250 мг/мл до около 350 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация PCSK9-связывающего слитого белка в композиции составляет около 250 мг/мл или около 300 мг/мл.

PCSK9-связывающий мотив содержит или состоит из аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 1):

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFVPSKGT
TISGLKPGVDYITVYAVEFDPPGAGYYHRPISINYTE.

PCSK9-связывающие петли показаны подчеркнутыми. В некоторых вариантах осуществления PCSK9-связывающий мотив представляет собой вариант SEQ ID NO: 1, имеющий от одной до пяти аминокислотных замен, делеций или вставок по отношению к SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные изменения производятся вне связывающих петель. В некоторых вариантах осуществления 1, 2 или 3 аминокислотные изменения производятся внутри связывающих петель.

PCSK9-связывающий мотив разработан для специфического нацеливания на PCSK9, при этом по существу сохраняя последовательность ¹⁰Fn3 дикого типа (WT), чтобы свести к минимуму присущую ему иммуногенность. См. патент США 8420098, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. PCSK9-связывающий мотив связывается с человеческим PCSK9 с суб-наномолярным сродством зависимым от концентрации образом.

В различных вариантах осуществления PCSK9-связывающий мотив имеет C-концевое слияние с аминокислотной последовательностью человеческого сывороточного альбумина (HSA). В некоторых вариантах осуществления HSA содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности, или по меньшей мере 85% идентичности, или по меньшей мере 90% идентичности, или по меньшей мере 95% идентичности, или по меньшей мере 98% идентичности, или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 2. Например, аминокислотная последовательность HSA может содержать от одного до десяти или от одного до пяти модификаций, независимо выбранных из аминокислотных замен, делеций и вставок относительно SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность HSA содержит остаток аланина в положении, соответствующем положению 34 SEQ ID NO: 2, как проиллюстрировано в SEQ ID NO: 2. В различных вариантах осуществления аминокислотная последовательность HSA имеет по меньшей мере 500 аминокислот в длину.

В некоторых вариантах осуществления PCSK9-связывающий мотив и аминокислотная последовательность HSA химически конъюгированы с использованием любого известного подхода к химической конъюгации.

HSA представляет собой многодоменный белок, состоящий из спиральных кластеров и содержащий 17 пар дисульфидных мостиков; только один остаток цистеина, Cys34, существует в виде свободной сульфгидрильной группы в природном HSA. В некоторых вариантах осуществления этот Cys замещен остатком аланина в PCSK9-связывающем слитом белке. Фрагмент HSA служит для увеличения периода полужизни в кровотоке PCSK9-связывающего слитого белка. В различных вариантах осуществления PCSK9-связывающий слитый белок, содержащий PCSK9-связывающий мотив и аминокислотную последовательность HSA, имеет молекулярную массу около 77 кДа.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность HSA представляет собой вариант, описанный в патенте США 9493545, патенте США 9821039, патенте США 9944691 или

публикации США 2014/0315817, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления PCSK9-связывающий мотив и аминокислотная последовательность HSA связаны путем генетического слияния, например, с аминокислотной последовательностью HSA на С-конце молекулы. Короткий аминокислотный линкер может соединять PCSK9-связывающий домен и аминокислотную последовательность HSA. Например, линкер может содержать от 2 до 20 аминокислот или, в некоторых вариантах осуществления, от 4 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления PCSK9-связывающий мотив и аминокислотная последовательность HSA соединяются посредством линкера, состоящего из 6 аминокислот. Линкер может состоять преимущественно из аминокислот серина, глицина, треонина и аланина. Например, линкер может представлять собой линкер, состоящий из серина/глицина. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности GSGSGS.

PCSK9-связывающий слитый белок может быть стабильно составлен в форме раствора при высокой концентрации. Например, состав не демонстрирует существенной деградации или образования частиц в условиях длительного хранения, например, при температуре около 5°C (например, от 2 до 8°C), или в условиях краткосрочного хранения в условиях окружающей среды (например, от 1 до 6 месяцев при температуре 25±3°C). PCSK9-связывающий слитый белок суспендирован в подходящем физиологическом растворе, например, солевом растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе, или буферном растворе, и может необязательно содержать поверхностно-активное вещество (например, неионогенное поверхностно-активное вещество). В некоторых вариантах осуществления состав содержит буферный агент, изотонический агент, необязательно поверхностно-активное вещество и растворитель.

Фармацевтически приемлемые носители включают воду, солевой раствор, глицерин. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать жирные масла, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль или другие растворители. В некоторых вариантах осуществления растворитель представляет собой воду.

Состав обычно представляет собой буферный раствор. Используемый в настоящем документе термин "буфер" относится к химическому агенту, который способен абсорбировать определенное количество кислоты или основания, не подвергаясь сильному изменению pH. Примеры буферов включают цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер, сукцинатный буфер и бикарбонатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буферный агент может содержать L-гистидин/L-гистидина моногидрохлорид. Например, при использовании буферной системы L-гистидин/L-гистидина моногидрохлорид, L-гистидин/L-гистидина моногидрохлорид может присутствовать в количестве от около 1 мг/мл до около 10 мг/мл, например, от около 2 мг/мл до около 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления буфер поддерживает pH состава в диапазоне от около pH 5,5 до около pH 7,2, такое как около pH 6,8 (например, pH от 6,6 до 7,0). В некоторых вариантах осуществления pH состава регулируют, например, с помощью хлористоводородной кислоты и/или гидроксида натрия. В некоторых вариантах осуществления соотношение L-гистидин/L-гистидина моногидрохлорид является таким, что корректировка pH не требуется.

В различных вариантах осуществления изотонические агенты, которые могут быть использованы по отдельности или в комбинации, включают декстрозу, сахарозу, глицерин, трегалозу, маннит, сорбит, аргинин, хлорид натрия или хлорид калия. В некоторых вариантах осуществления изотонический агент содержит или состоит из хлорида натрия. Например, состав может содержать от около 2 до около 20 мг/мл хлорида натрия (например, от 6 до 12 мг/мл хлорида натрия), или же один или несколько изотонических агентов в количестве, эквивалентном осмоляльности от 2 до 20 мг/мл хлорида натрия (или от 6 до 12 мг/мл хлорида натрия).

В некоторых вариантах осуществления состав содержит поверхностно-активное вещество, которое может действовать в качестве солюбилизующего агента. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество. Примеры неионогенных поверхностно-активных веществ включают полисорбатные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20, 40, 60 или 80. Например, состав может содержать полисорбат 80. Другие фармацевтически приемлемые неионогенные поверхностно-активные вещества также могут быть использованы, по отдельности или в комбинации. В некоторых вариантах осуществления состав не содержит поверхностно-активного вещества.

Иллюстративные составы включают цитратный буфер (например, 10-50 мМ, pH от 5,6 до 6,0), гистидиновый буфер (например, от 10 мМ до 50 мМ, pH от 6,0 до 7,0) или сукцинатный буфер (например, от 10 до 50 мМ, pH от 5,5 до 6,0). В некоторых вариантах осуществления состав содержит вспомогательное вещество, выбранное из аргинина (например, от 100 до 200 мМ), NaCl (например, от 100 до 200 мМ), сорбита (например, от 100 до 300 мМ) или сахарозы (например, от 100 до 300 мМ). В некоторых вариантах осуществления состав содержит поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80 (например, от 0,01 до 0,5 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления состав не содержит поверхностно-активного вещества.

В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит консервант, такой как фенол, мета-крезол или бензоат натрия.

В некоторых вариантах осуществления состав PCSK9-связывающего слитого белка состоит в ос-

новном из (в дополнение к активному агенту, как описано): L-гистидина, L-гистидина моногидрохлорида, хлорида натрия и полисорбата-80. Иллюстративные варианты осуществления показаны в следующей табл. 1.

Компонент	Диапазон	Иллюстративные варианты осуществления ($\pm 10\%$)	Функция
PCSK9-связывающий слитый белок	100 - 300 мг/мл	250 мг/мл 300 мг/мл	Активный ингредиент
L-Гистидин	1-5 мг/мл	2,6 мг/мл	Буферный агент
L-Гистидин моногидрохлорид	0,5-2 мг/мл	0,7 мг/мл	Буферный агент
Хлорид натрия	2-20 мг/мл	8,8 мг/мл	Изотонический агент
Полисорбат-80	0,0-0,5 мг/мл	0,2 мг/мл	Поверхностно-активное вещество

Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию могут быть удобным образом представлены в формах стандартных доз, содержащих предварительно определенное количество активного агента по раскрытию на дозу.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержится в шприце-ручке. Автоинъекторы, такие как "шприц-ручка", представляют собой пружинные шприцы, предназначенные для доставки дозы конкретного лекарственного средства. По конструкции шприцы-ручки просты в использовании и предназначены для самостоятельного введения пациентами или введения необученным персоналом. Шприцы-ручки разработаны для того, чтобы преодолеть нерешительность, связанную с самостоятельным введением с помощью устройства для доставки лекарственных средств на основе иглы. Шприц-ручка сохраняет кончик иглы закрытым колпачком до инъекции, а также имеет механизм пассивной безопасности для предотвращения случайного срабатывания (инъекции). Глубина инъекции может регулироваться или фиксироваться, и может быть включена функция снятия колпачка иглы. При нажатии на кнопку игла шприца автоматически вводится в подкожную ткань и происходит доставка лекарственного средства. После выполнения инъекции некоторые шприцы-ручки имеют визуальную или звуковую индикацию, подтверждающую введение полной дозы.

В некоторых вариантах осуществления шприц-ручка содержит от 1 до 10 стандартных доз или от 1 до 5 стандартных доз. В некоторых вариантах осуществления стандартные дозы составляют не более чем около 1,5 мл или около 1 мл по объему (независимо от того, содержатся ли они или доставляются шприцем-ручкой). В некоторых вариантах осуществления стандартные дозы составляют не более 0,8 мл по объему или не более 0,7 мл по объему. В некоторых вариантах осуществления шприц-ручка доставляет микродозу, например, имеющую объем в диапазоне от около 50 мкл до около 500 мкл, или объем в диапазоне от около 75 мкл до около 250 мкл. В некоторых вариантах осуществления микродоза имеет объем от 100 до 200 мкл. В различных вариантах осуществления шприц-ручка или другое устройство для подкожной доставки обеспечивает дозу, содержащую от 30 до около 450 мг PCSK9-связывающего слитого белка. В различных вариантах осуществления стандартная доза составляет от около 50 до около 400 мг или от около 50 до около 300 мг. В некоторых вариантах осуществления стандартная доза составляет по меньшей мере 200 мг или по меньшей мере 250 мг, или по меньшей мере 300 мг. В некоторых вариантах осуществления стандартная доза составляет от около 250 мг до около 350 мг (например, около 300 мг). Количество активного агента, доставляемого на стандартную дозу, можно регулировать в зависимости от желаемой частоты введения. Например, в некоторых вариантах осуществления дозу от 20 до около 75 мг вводят в виде еженедельной микродозы (например, в объеме менее чем около 0,25 мл или менее чем около 0,15 мл). В других вариантах осуществления дозу от около 200 до около 450 мг вводят примерно каждые две недели, раз в месяц или раз в два месяца, при этом объем находится в диапазоне от около 0,7 до 1,5 мл. В некоторых вариантах осуществления дозу от около 275 мг до около 350 мг (например, около 300 мг) вводят раз в четыре недели путем подкожной инъекции, при этом объем составляет около 1,5 мл или меньше, или около 1 мл или менее.

Композиция или состав подходит для введения подкожным, внутримышечным, внутрикожным или внутривенным путем. Высокая концентрация, относительно низкая вязкость и надлежащая осмоляльность состава обеспечивают переносимость пациентом, режимы менее частого дозирования и меньшие

объемы. Как продемонстрировано в настоящем документе, максимальное подавление PCSK9 достигается при относительно низкой концентрации PCSK9-связывающего слитого белка, и более высокие концентрации позволяют увеличить продолжительность подавления. В некоторых вариантах осуществления субъект получает стандартную дозу композиции примерно один раз каждую 1 неделю (например, путем введения раз в неделю микродозы), или примерно один раз каждые 2 недели, или примерно один раз каждые 3 недели, или примерно один раз каждые 4 недели (например, примерно один раз в месяц), или примерно один раз каждые 6 недель, или примерно один раз каждые 8 недель (примерно один раз каждые 2 месяца).

Композицию можно вводить для лечения связанного с PCSK9 нарушения у субъекта-человека. Нарушения, связанные с PCSK9, описаны в патентах США 8420098, 9238027 и 9856306, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления пациент нуждается в снижении уровня LDL (например, LDL-холестерина). В некоторых вариантах осуществления субъект может демонстрировать заболевание, связанное с холестерином, такое как гиперхолестеринемия и/или атеросклероз. В различных вариантах осуществления субъект демонстрирует состояние, выбранное из нарушения липидного обмена, гиперхолестеринемии, гиперлипопротеинемии, гиперлипидемии, дислипидемии, ишемической болезни сердца, атеросклероза и сахарного диабета. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется семейная гиперхолестеринемия. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или находится в группе высокого риска сердечно-сосудистого заболевания (например, атеросклеротической ишемической болезни сердца).

Гиперхолестеринемия представляет собой состояние, характеризующееся повышенным уровнем холестерина в сыворотке крови. Повышенный уровень холестерина в сыворотке имеется у значительной части населения и является важным фактором риска развития атеросклероза и инфаркта миокарда. Пациентам с гиперхолестеринемией обычно вводят препараты, снижающие уровень холестерина, такие как ингибиторы HMG-CoA-редуктазы ("статины"). "Семейная гиперхолестеринемия" (FH) представляет собой генетическое нарушение, характеризующееся высоким уровнем холестерина, в частности, очень высоким уровнем липопротеинов низкой плотности (например, LDL-холестерина) в крови и ранним сердечно-сосудистым заболеванием. Для индивидуумов с FH высокие уровни холестерина менее чувствительны к традиционным способам контроля уровня холестерина (таким как терапия статинами).

Семейная гиперхолестеринемия (FH) представляет собой аутосомно-доминантное метаболическое нарушение, характеризующееся мутацией или мутациями в гене LDL-рецептора (LDL-R) или в других генах, участвующих в регуляции липидов, значительно повышенным уровнем LDL-C и преждевременным началом атеросклероза. В некоторых вариантах осуществления гиперхолестеринемия представляет собой гомозиготную семейную гиперхолестеринемию или HoFH, которая представляет собой состояние, характеризующееся мутацией как в материнском, так и в отцовском генах LDL-R.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется гетерозиготная FH. Гетерозиготную FH обычно лечат статинами, секвестрантами желчных кислот или другими гиполипидемическими средствами, которые снижают уровни холестерина.

В некоторых вариантах осуществления гиперхолестеринемия представляет собой полигенную гиперхолестеринемию, которая представляет собой состояние, характеризующееся повышенным уровнем холестерина, который является результатом влияния множества генетических факторов. В некоторых вариантах осуществления полигенная гиперхолестеринемия может усугубляться приемом липидов с пищей.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят вместе с терапией статинами или другой пероральной гиполипидемической терапией. Композиция в таких вариантах осуществления будет обеспечивать дополнительное снижение LDL-C. В некоторых вариантах осуществления композиция представлена в качестве монотерапии гиперхолестеринемии, то есть без терапии статинами или другой пероральной гиполипидемической терапии. Например, в таких вариантах осуществления у субъекта может быть непереносимость статинов. "Непереносимость статинов" возникает, когда пациент не может продолжать прием статинов из-за развития побочного эффекта или отклонений, указывающих на функцию печени или мышечную функцию (креатинкиназа) после анализа крови. В некоторых вариантах осуществления непереносимость статинов может быть частичной (т.е. только некоторые статины в некоторых дозах) или полной (т.е. все статины в любой дозе). В некоторых вариантах осуществления непереносимость статинов приводит к ломоте в мышцах, болям, слабости или судорогам (то есть миалгии); встречается у 15% получавших лечение пациентов.

Если не указано иное, термин "около", используемый в настоящем документе, означает $\pm 10\%$ от соответствующего числового значения.

Варианты осуществления изобретения теперь будут описаны с помощью следующих примеров.

Примеры

Пример 1. PCSK9-связывающий слитый белок и поведение ПК-PD.

PCSK9-связывающий слитый белок содержит модифицированный домен фибронектина (аднектин), нацеленный против пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), и сывороточный альбумин человека (фиг. 1). Слитый белок имеет общую молекулярную массу приблизительно 77000 Дальтон. PCSK9-связывающий слитый белок имеет высокую аффинность связывания с PCSK9 человека и в

>100 раз более слабую аффинность в отношении PCSK9 яванского макака. Несмотря на это различие в аффинности связывания, нечеловеческий примат (NHP) считается подходящим видом для тестирования безопасности и фармакологии PCSK9-связывающего слитого белка, поскольку у NHP достигается максимальное подавление свободного PCSK9 и максимальное снижение LDL-C.

PCSK9-связывающий слитый белок разрабатывали для подкожного (SC) введения для лечения, например, гиперхолестеринемии, в том числе у пациентов с семейной гиперхолестеринемией или гиперхолестеринемией и атеросклеротической ишемической болезнью сердца (CHD). Двумя основными детерминантами фармакокинетики (PK) PCSK9-связывающего слитого белка являются взаимодействие с его мишенью, PCSK9, и способность рециркулировать через неонатальный Fc рецептор (FcRn) и минимизировать почечную фильтрацию, тем самым снижая клиренс PCSK9-связывающего слитого белка и увеличивая период полувыведения. Исследования на мышах дикого типа не могут оценить влияние каждой из этих детерминант на PK PCSK9-связывающего слитого белка, поскольку PCSK9-связывающий слитый белок не связывается эффективно с мышинным PCSK9, и HSA не взаимодействует с мышинным FcRn. Таким образом, яванский макак обеспечивает наиболее подходящую модель *in vivo* для оценки PK-PD PCSK9-связывающего слитого белка, поскольку связывание с PCSK9 в этой модели приводит к снижению как свободного PCSK9, так и LDL-C; кроме того, HSA может эффективно рециркулировать через рецептор FcRn NHP.

Трансгенную мышь hPCSK9 использовали для исследования аффинности связывания *in vivo* PCSK9-связывающего слитого белка с hPCSK9, и способность PCSK9-связывающего слитого белка рециркулировать через hFcRn также оценивали у мыши hFcRn. Эта мышинная модель FcRn человека несет нулевую мутацию мышинного гена FcRn и трансген, экспрессирующий α -цепь человеческого FcRn под контролем его природного человеческого промотора. Следовательно, эти мыши служат в качестве модели для оценки фармакокинетики моноклональных антител и сывороточного альбумина человека.

Существует обширный набор данных, подтверждающих взаимосвязь между подавлением системных уровней свободного PCSK9 и снижением сывороточного LDL-C для анти-PCSK9 антител. Gadkar K et al., A Mechanistic Systems Pharmacology Model for Prediction of LDL Cholesterol Lowering by PCSK9 Antagonism in Human Dyslipidemic Populations, *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2014; 3(11): 1-9; Squizzato A, et al., PCSK9 inhibitors for treating dyslipidemia in patients at different cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Intern. Emerg. Med.* 2017; Jul:el-11. См. фиг. 2B. Чтобы оценить человеческую дозу PCSK9-связывающего слитого белка (LIB003, SEQ ID NO:3), необходимую для достижения желаемого целевого уровня снижения LDL-C, аллометрическое масштабирование данных, полученных в вышеуказанных исследованиях, включали в трансляционную полумеханистическую модель, которая включала известную взаимосвязь между PCSK9 и LDL-C. Фиг. 2A. Ожидаемую взаимосвязь доза-эффект для LIB003 и сывороточного LDL-C конструировали с использованием этой модели. TK-PD у нечеловеческих приматов.

Поведение TK-PD LIB003 характеризовали после внутривенного (IV) и подкожного (SC) введения в исследовании, не предусматривающее применение требований GLP, по определению диапазона доз (dose range finding, DRF) с однократным введением доз (IV дозы 10, 30, 100, 200 мг/кг; SC доза 200 мг/кг) и после повторного введения в GLP-исследованиях токсичности в течение 4 недель (IV доза 100 мг/кг; SC дозы 30 и 100 мг/кг), 12 недель (SC дозы 30 и 100 мг/кг) или 26 недель (SC дозы 30 и 100 мг/кг).

Анализ TK для LIB003 выполняли как электрохимический люминесцентный анализ с захватом мишени, с hPCSK9 в качестве реагента захвата и меченым рутением кроличьим поликлональным антителом против HSA в качестве реагента для детекции. У NHP анализ измеряет общий LIB003 (из-за более сильного родства к реагенту захвата, hPCSK9, по сравнению с PCSK9 NHP). Альтернативно, в анализе TK использовали LIB003-специфическое mAb в качестве реагента захвата и меченное рутением кроличье поликлональное антитело против HSA в качестве реагента для детекции. Этот формат анализа также измеряет общий LIB003. Результаты этих исследований указывают на то, что в этом диапазоне доз после внутривенного и подкожного введения кинетики общего PCSK9-связывающего слитого белка являются приблизительно линейными и пропорциональными дозе.

В исследовании DRF стойкий ответ антитела к лекарственному средству (ADA) присутствовал при всех уровнях доз выше 10 мг/кг. После однократной дозы LIB003 присутствие антител к лекарственному средству (ADA) в этом исследовании в большинстве случаев связано с быстрой утратой воздействия LIB003 и предшествовало утрате захвата цели (снижение свободного PCSK9). Хотя антитела к лекарственному средству (ADA) были обнаружены у большинства животных после еженедельного введения PCSK9-связывающего слитого белка (4-недельные, 12-недельные и 26-недельные GLP-исследования токсичности), воздействие PCSK9-связывающего слитого белка сохранялось на протяжении всего интервала дозирования и влияние антител к лекарственному средству (ADA) на TK/PD было выраженным только у двух животных (4-недельное исследование), одного животного (12-недельное исследование) и одного животного (26-недельное исследование).

При отсутствии воздействия антител к лекарственному средству (ADA) LIB003 выводился медленно, и конечный период полувыведения из сыворотки варьировался в диапазоне 8,3-10,4 дней (в среднем 9 дней) в исследовании DRF и в диапазоне 7,6-9,2 дня (в среднем 8,3 дня) у выздоровевших животных в

4-недельном GLP-исследовании токсичности; согласуется с поведением альбуминоподобной молекулы у нечеловеческих приматов. Аналогичные результаты наблюдались в 12-недельных и 26-недельных GLP-исследованиях токсичности. В исследовании DRF после однократного IV введения клиренс (CL) варьировался в диапазоне 5,63-7,65 мл/день/кг (в среднем 6,64 мл/день/кг), и объем распределения (V_z) варьировался в диапазоне 67,6-103,8 мл/кг (в среднем 86,4 мл/кг) у животных, у которых это можно было определить.

Общая концентрация PCSK9 (связанного и несвязанного с LIB003) медленно возрастала, при этом пик появлялся примерно через 7 дней после дозирования, и в этот момент общая концентрация PCSK9 составляла <10% от циркулирующей концентрации LIB003. Захват цели, измеряемый по свободному PCSK9 и снижению LDL, является максимальным при всех дозах в исследовании DRF, что указывает на максимальное подавление мишени при самой низкой тестируемой дозе (10 мг/кг). Результаты указывают на то, что в отсутствие антител к лекарственному средству (ADA) увеличение дозы LIB003 увеличивало продолжительность максимального захвата мишени.

Независимо от дозы или способа введения LDL в сыворотке подавлялся примерно на 60%, что соответствовало максимальному фармакодинамическому эффекту при всех уровнях доз. Как и ожидалось, утрата подавления LDL и возвращение к исходным уровням соответствовали утрате максимального захвата PCSK9. В целом, эти исследования демонстрируют, что максимальный фармакодинамический эффект был достигнут, и более высокие дозы не привели бы к большему подавлению свободного PCSK9 или LDL.

После подкожной дозы концентрация C_{max} была ниже, и время T_{max} возникало позже по сравнению с медленным внутривенным (IV) болюсом при том же уровне дозы, что указывает на абсорбцию из участка инъекции в системный кровоток. Абсолютная биодоступность при подкожном введении, согласно оценкам, составляет около 76% в исследовании DRF и 66,5-89,7% в 4-недельном GLP-исследовании, хотя обе оценки скомпрометированы присутствием антител к лекарственному средству (ADA) и невозможностью охарактеризовать общую площадь под кривой (AUC) после подкожного введения. Комбинированный анализ обоих исследований с использованием популяционной PK-модели оценивает биодоступность после подкожного введения равной 92% и, вероятно, будет более надежной оценкой, поскольку модель оценивает общую AUC для обоих способов введения.

Прогнозируемое поведение PK-PD у человека

Данные, полученные в нескольких исследованиях, объединяли для предсказания ожидаемого поведения PK-PD LIB003 у человека. А именно, популяционную двухкомпарментную модель связывания PK-PD, описывающую воздействие LIB003 и подавление PCSK9, конструировали на основе данных NHP (исследование DRF и 4-недельное GLP-исследование токсичности). При переносе этих параметров на человека аффинность связывания *in vivo* с hPCSK9 получали из исследований PK-PD на hPCSK9 трансгенных мышах. Эти данные были адекватно описаны с помощью однокомпарментной модели PK, поскольку доступны только данные после подкожного введения; в остальном модель была эквивалентна той, которую использовали для данных NHP. Наблюдаемое различие в аффинности связывания LIB003 с PCSK9 NHP и hPCSK9 соответствовало данным, полученным как *in vitro*, так и *in vivo*, и значение K_D , полученное *in vivo* у hPCSK9 трансгенной мыши, использовали для предсказания у человека.

Таблица 2

Виды	Аффинность связывания с PCSK9 <i>in vitro</i> (нМ)	Аффинность связывания с PCSK9 <i>in vivo</i> (нМ)
NHP	8,1	56,4
Человек	0,06	0,15

Клиренс LIB003 как у NHP, так и у hFcRn мышей соответствовал ожидаемому клиренсу HSA у этих животных, и поэтому было предсказано, что клиренс LIB003 будет имитировать клиренс HSA у человека (период полувыведения 19 дней; аллометрическая экспонента 0,74). Другие параметры масштабировали аллометрически с использованием ожидаемых коэффициентов для терапевтического слитого с альбумином белка размером приблизительно 77 кДа.

Общая структура модели PK-PD связывания у NHP и человека, описывающая захват и подавление свободного PCSK9, показана на фиг. 2А и 2В. Модель количественной системной фармакологии была ранее создана для описания механизма действия статинов и анти-PCSK9 антитела у человека. Gadkar K et al., A Mechanistic Systems Pharmacology Model for Prediction of LDL Cholesterol Lowering by PCSK9 Antagonism in Human Dyslipidemic Populations, CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. 2014; 3(11). Эту модель использовали для обеспечения связи между предсказанным подавлением PCSK9 у человека и снижением LDL-C с течением времени после однократного подкожного и внутривенного введения доз LIB003 в исследовании First in Human (FIH).

Пример 2. Состав и оценка стабильности.

Оценивали эффективность различных буферов и вспомогательных веществ в составе PCSK9-

связывающего слитого белка.

Чтобы определить подходящий буфер и pH для использования в составе, 18 различных буферов и условий pH с использованием 6 различных буферов при 2 мг/мл LIB003 анализировали с помощью DSC для оценки термической стабильности и DLS для оценки образования агрегатов. Из этих экспериментов были исключены значения pH ниже 5 и выше 7 из-за того, что для этих значений pH разворачивание белка начиналось при температуре <math>< 50^{\circ}\text{C}</math> (Tonset).

Анализируемые комбинации буфер/pH показаны ниже в табл. 3. Комбинации, выбранные для дальнейшего скрининга, указаны значением pH, выделенным жирным шрифтом и подчеркнутым.

Таблица 3

Скрининг буфер/pH

Буфер	pH
Ацетат pKa = 4,76	4,2
	4,5
	5,0
	5,5
Сукцинат pKa = 5,64	4,2
	4,5
	<u>5,0</u>
	<u>5,5</u>
	6,5
Цитрат pKa = 6,4	5,0
	<u>6,0</u>
	7,0
Гистидин pKa = 6,04	6,0
	<u>7,0</u>
Фосфат pKa = 7,2	6,5
	7,5
Трис pKa = 8,1	7,5
	8,0

После идентификации приемлемого диапазона pH и подходящего буфера вспомогательные вещества исследовали в комбинации с определенными буферами и значениями pH. Всего готовили 15 различных комбинаций буфер/вспомогательное вещество при концентрации LIB003 2 мг/мл и анализировали с помощью DSC для оценки термической стабильности и DLS для оценки образования агрегатов. Три комбинации буфер/вспомогательное вещество были исключены из-за того, что начальная температура Tonset была ниже 55°C. Кроме того, данные DLS свидетельствуют о том, что использование сахарозы, сорбита и низких концентраций NaCl приводит к агрегации, и поэтому их использование было ограничено в последующих составах.

Анализируемые комбинации буфер/вспомогательное вещество показаны ниже в табл. 4. Комбинации, выбранные для дальнейшего скрининга, указаны с помощью вспомогательного вещества, выделенного жирным шрифтом и подчеркнутого.

Таблица 4

Скрининг буфер/вспомогательное вещество

Буфер/pH	Вспомогательное вещество
20 мМ Сукцинат, pH 5,5	50 мМ NaCl
	<u>150 мМ NaCl</u>
	<u>150 мМ Аргинин</u>
	<u>250 мМ Сорбит</u>
	<u>250 мМ Сахароза</u>
20 мМ Цитрат, pH 6,0	<u>50 мМ NaCl</u>
	<u>150 мМ NaCl</u>
	<u>150 мМ Аргинин</u>
	<u>250 мМ Сорбит</u>
	<u>250 мМ Сахароза</u>
20 мМ Гистидин, pH 7,0	<u>50 мМ NaCl</u>
	<u>150 мМ NaCl</u>
	<u>150 мМ Аргинин</u>
	250 мМ Сорбит
	250 мМ Сахароза

Для определения подходящих комбинаций буфера и вспомогательного вещества для поддержания стабильности LIB003, составленного в высоких концентрациях, выполняли скрининг растворимости на 12 различных составах, указанных выше в табл. 4. Эти составы концентрировали до целевых концентраций 200 мг/мл, 250 мг/мл, 300 мг/мл и 340 мг/мл. Мутность была одинаковой по всем составам и агрегации не наблюдалось при оценке с помощью SEC-HPLC. На основании этих параметров эти составы считались эквивалентными.

Для оценки потенциальной пользы от добавления поверхностно-активного вещества к составам-кандидатам LIB003 восемь комбинаций буфер/вспомогательное вещество из табл. 4 оценивали с полисорбатом 80 (PS80) или без него в общей сложности для 16 составов при 250 мг/мл LIB003 (табл. 5). Поскольку PS80 может быть эффективным в отношении предотвращения агрегации и образования частиц, составы-кандидаты оценивали в отношении их способности выдерживать повторные стрессовые воздействия замораживания-оттаивания и перемешивания. Никаких различий не наблюдалось по признакам склонности к выделению, мутности или агрегации (согласно оценкам DLS и SEC). Все составы, содержащие PS80, были улучшены благодаря предполагаемой пользе PS80 при долгосрочном хранении и перемещении продукта.

Таблица 5

Скрининг комбинации буфер/вспомогательное вещество и
поверхностно-активного вещества

Буфер/pH	Вспомогательное вещество	Поверхностно-активное вещество (PS80)
20 мМ Сукцинат, pH 5,5	150 мМ NaCl	-
		+
	250 мМ Сорбит	-
		+
	250 мМ Сахароза	-
		+
20 мМ Цитрат, pH 6,0	150 мМ Аргинин 20 мМ Цитрат, pH 6,0	-
		+
	250 мМ Сорбит	-
		+
	250 мМ Сахароза	-
		+
	150 мМ NaCl	-
		+
20 мМ Гистидин, pH 7,0	150 мМ NaCl	-
		+

Стабильность L1B003 и отсутствие различий между составами при нормальных условиях хранения и напряжениях сдвига, даже при высоких концентрациях L1B003, дают основание предположить, что требуется альтернативный подход к идентификации состава для L1B003, который будет выдерживать условия длительного хранения. В составы, идентифицированные при скрининге комбинаций буфер/вспомогательное вещество (табл. 4) при целевых концентрациях 340 мг/мл, добавляли 0,02% PS80, хранили при 2-8°C или 50°C в течение трех недель и анализировали с помощью SEC-HPLC. В целом, низкие уровни высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) соединений наблюдались через 3 недели хранения при 50°C. Составы, содержащие цитрат, сужались до вспомогательных веществ аргинина и сорбита из-за низкого процентного содержания HMW-соединений в этих составах. Из составов, содержащих гистидин, для дополнительных экспериментов выбирали 150 мМ NaCl, исходя из самого высокого процентного содержания соединений, соответствующих главному пику. Наконец, сукцинат был исключен из дальнейшего рассмотрения из-за повышенных уровней HMW и LMW соединений, наблюдаемых в большинстве составов, содержащих сукцинат, хранящихся при 50°C, по сравнению с контрольным образцом препарата сравнения, хранящимся при 2-8°C.

Результаты этих анализов показаны ниже в табл. 6; предпочтительные составы выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 6

Оценка LIB003 при высокой концентрации, хранящегося при 50°C
в течение 3 недель, с помощью SEC-HPLC

Буфер/pH	Вспомогательное вещество	%HMW	%Основного соединения	%LMW
20 мМ Сукцинат, pH 5,5	150 мМ NaCl	3,1	96,2	0,8
	150 мМ Аргинин	1,7	97,7	0,6
	250 мМ Сорбит	3,9	95,4	0,7
	250 мМ Сахароза	3,3	96,1	0,6
20 мМ Цитрат, pH 6,0	50 мМ NaCl	1,8	97,9	Below LOQ
	150 мМ NaCl	2,0	97,6	Below LOQ
	150 мМ Аргинин	1,1	98,3	Below LOQ
	250 мМ Сорбит	1,1	98,6	Below LOQ
	250 мМ Сахароза	1,2	98,5	Below LOQ
20 мМ Гистидин, pH 7,0	50 мМ NaCl	2,6	97,0	Below LOQ
	150 мМ NaCl	1,0	98,6	Below LOQ
	150 мМ Аргинин	1,0	98,3	0,8

HMW = высокомолекулярное; LMW = низкомолекулярное; LOQ = предел
количественного определения; мМ = миллимолярное; NaCl = хлорид натрия.

Для дальнейшего изучения составов-кандидатов, LIB003 составляли при концентрации 250 мг/мл в трех комбинациях буфер/вспомогательное вещество с PS80 при 3 различных значениях pH (табл. 7). Образцы хранили при 2-8°C или 50°C в течение трех недель для индукции деградации и анализировали на концентрацию/выделение LIB003 (A280), частицы (DLS), агрегацию (SEC-HPLC), профиль заряда (icIEF), клиппирование (CE-SDS), активность, мутность и термическую стабильность (DSC). Сравнение профилей заряда, склонности к агрегации/образованию частиц и относительной активности после хранения при 50°C в течение 3 недель продемонстрировало некоторое различие между составами (табл. 8, 9, 10 и 11). Профили CE-SDS, выделение, мутность и термическая стабильность были сопоставимы между составами.

Таблица 7

Составы-кандидаты до хранения

Состав	Целевое pH	Фактич pH	Концентрация (мг/мл)	SEC-HPLC			icIEF		
				%HMW/%Осн./%LMW	%Кисл./%Осн./%Щел				
20 мМ Цитрат, 150 мМ Аргинин, 0,02% PS80	5,5	5,6	274,4	0,8	99,2	ND	30,1	68,3	1,6
		5,7	259,0	0,6	99,3	ND	30,2	68,1	1,7
	6,0	6,1	271,6	0,9	99,2	ND	30,8	67,4	1,8
		6,1	254,1	0,8	99,2	ND	31,6	66,3	2,1
	6,5	6,5	260,2	0,9	99,1	ND	30,8	67,4	1,8
		6,5	267,9	1,0	99	ND	31,1	67,1	1,8
20 мМ Цитрат, 250 мМ Сорбит, 0,02% PS80	5,5	5,6	259,6	0,8	99,2	ND	30,7	67,7	1,6
		5,6	258,9	0,6	99,3	ND	32,7	65,5	1,8
	6,0	6,0	268,3	1,1	98,9	ND	31,1	67,3	1,6
		6,0	271,0	0,8	99,2	ND	30,6	67,8	1,7
	6,5	6,5	266,8	1,0	99	ND	33,3	65,6	1,1
		6,5	261,4	0,7	99,3	ND	30,7	67,7	1,6
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, 0,02% PS80	6,0	6,0	248,7	0,7	99,3	ND	30,1	68,1	1,8
		6,0	263,9	0,9	99,1	ND	31,3	66,3	2,4
	6,5	6,5	260,4	0,7	99,3	ND	31,6	66,1	2,4
		6,5	260,5	0,9	99,2	ND	29,7	68,5	1,8
	7,0	6,9	267,3	0,9	99,1	ND	29,8	68,0	2,1
		7,0	267,2	0,8	99,3	ND	30,1	68,1	1,9

ND = не определено

Таблица 8

Изменение распределения заряда после хранения при 50°C в течение 3 недель по данным iCEP

Состав	pH	Изменение видов зарядов (хранение при 50 °С по сравнению с 2-8 °С)		
		Кислотный	Основной	Щелочной
20 мМ Цитрат, 150 мМ Аргинин, 0,02% PS80	5,6	0,8	-22,0	21,2
	5,7	3,2	-23,3	20,1
	6,1	4,6	-8,3	3,7
	6,1	5,1	-7,2	2,1
	6,5	6,9	-11,1	4,3
	6,5	4,4	-9,7	5,3
20 мМ Цитрат, 250 мМ Сорбит, 0,02% PS80	5,6	-1,5	-31,2	32,7
	5,6	2,4	-30,3	27,9
	6,0	5,5	-12,8	7,3
	6,0	6,0	-12,8	6,8
	6,5	4,3	-8,5	4,4
	6,5	6,8	-9,1	2,3
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, 0,02% PS80	6,0	2,6	-19,5	16,7
	6,0	4,9	-15,5	10,5
	6,5	9,2	-10,7	1,4
	6,5	10,4	-13,3	2,8
	6,9	10,3	-11,6	1,4
	7,0	12,4	-15,0	2,5

Таблица 9

Изменение HMW и LMW соединений после хранения при 50°C в течение 3 недель по данным SEC-HPLC

Состав	pH	Изменение при 50 °С по сравнению с 2-8 °С		
		HMW	Основной	LMW
20 мМ Цитрат, 150 мМ Аргинин, 0,02% PS80	5,6	25,5	-26,4	1,0
	5,7	20,7	-21,7	1,0
	6,1	5,2	-6,2	1,0
	6,1	4,8	-5,8	1,0
	6,5	2,6	-3,8	1,1
	6,5	2,5	-3,2	0,7
20 мМ Цитрат, 250 мМ Сорбит, 0,02% PS80	5,6	42,0	-42,5	0,5
	5,6	38,2	-38,9	0,7
Сорбит, 0,02% PS80	6,0	12,3	-13,1	0,8
	6,0	11,6	-12,5	0,9
	6,5	4,2	-5,0	0,8
	6,5	3,6	-4,7	1,0
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, 0,02% PS80	6,0	20,9	-22,1	1,2
	6,0	16,5	-17,4	0,9
	6,5	5,7	-6,9	1,2
	6,5	6,4	-7,5	1,1
	6,9	2,4	-3,5	1,0
	7,0	3,9	-5,2	1,3

Таблица 10

Активность в зависимости от температуры хранения

Состав	% Относительная активность		Изменение % относительной активности
	2-8 °С	50 °С	
20 мМ Цитрат, 150 мМ Аргинин, 0,02% PS80, pH 6,0	113,7	97,8	-15,9
	93,5	80,2	-13,3
20 мМ Цитрат, 250 мМ Сорбит, 0,02% PS80 pH 6,0	106	70,5	-35,6
	103,4	75,1	-28,3
20 мМ Гистидин, 150 мМ NaCl, 0,02% PS80 pH 6,5	98,9	78,5	-20,5
	100	82,1	-17,9

Учитывая цель доставки LIB003 в виде подкожной (SC) инъекции 0,25-1,5 мл с использованием автоинъектора с иглой 27G или меньшего калибра, были проведены дополнительные эксперименты, чтобы определить, будет ли LIB003, составленный при концентрации 250 мг/мл, иметь свойства, подходящие для SC инъекции через автоинъектор. Три верхних состава при концентрации 250 мг/мл с соответствующим pH в центральной точке оценивали на вязкость, осмоляльность и наличие частиц. Целевые показатели были <15 сП для вязкости, 250-350 мОсм для осмоляльности и уровни частиц значительно ниже нормативных пределов. Результаты показаны ниже в табл. 11. Уровни частиц были сравнительно низкими во всех составах.

Таблица 11

Результаты анализа вязкости и осмоляльности

Состав	Преп	Осмоляльность (мОсм)	Вязкость (сП)	Концентрация (мг/мл)
20 мМ Цитрат 150 мМ Аргинин pH 6,0	1	355	11,5	250,2
	2	365	14,4	266,0
20 мМ Цитрат 250 мМ Сорбит pH 6,0	1	415	17,5	254,5
	2	420	16,9	267,8
20 мМ Гистидин 150 мМ NaCl pH 6,5	1	335	10,2	242,8
	2	329	11,3	269,0

Для дополнительных исследований стабильности PCSK9-связывающий слитый белок составляли в виде стерильного раствора для инъекции (подкожной) в 20 мМ гистидина, 150 мМ NaCl, 0,02% (мас./об.) полисорбата-80, pH 6,8. Эти исследования стабильности включали оценки в условиях длительного хранения, ускоренных условиях, а также в стрессовых условиях. Предполагаемая температура длительного хранения PCSK9-связывающего слитого белкового продукта составила $5\pm 3^\circ\text{C}$, и температура краткосрочного хранения ($\leq 1-6$ месяцев) составила $25^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$.

Данные по стабильности для 1 месяца получали при предполагаемой температуре хранения ($5^\circ\text{C}\pm 3^\circ\text{C}$), а также в ускоренных ($25\pm 2^\circ\text{C}/60\pm 5\%$ относительной влажности (RH)) и стрессовых ($40\pm 2^\circ\text{C}/75\pm 5\%$ RH) условиях хранения.

Для партии иллюстративного PCSK9-связывающего слитого белкового продукта данные для всех подвергнутых оценке параметров, включая параметры, указывающие на стабильность (icIEF, активность, CE-SDS и SEC-HPLC) в протоколе исследования стабильности, находились в пределах критериев приемлемости в исследуемый момент времени (1 месяц) и при каждом условии хранения. Кроме того, в условиях длительного хранения не наблюдалось значительного увеличения количества агрегирующих или деградирующих соединений, или снижения активности. Небольшое увеличение агрегатов (~1%) наблюдалось с помощью SEC-HPLC для ускоренных и стрессовых условий, однако результаты находятся в рамках критериев приемлемости для основного пика по данным SEC-HPLC, и никаких изменений активности не наблюдалось. Также, небольшое увеличение фрагментов (~2%) наблюдалось с помощью анализа CE-SDS в восстановительных условиях в стрессовых условиях, но, опять же, сопутствующего измене-

ния активности не наблюдалось. Небольшое увеличение (~1-4%) вариантов, отличающихся кислотными зарядами, с сопутствующим уменьшением соединений, соответствующих главному пику, наблюдалось с помощью icIEF при каждом условии хранения (примечательно, что для лекарственного вещества наблюдалась противоположная тенденция, указывающая, что, возможно, наблюдаемые изменения находятся в пределах вариабельности способа). Никаких изменений во внешнем виде, физико-химических показателях или активности не наблюдалось. Взятые вместе, данные по стабильности демонстрируют, что PCSK9-связывающий слитый белковый продукт является стабильным в течение 1 месяца при оценке в условиях длительного хранения, ускоренных и стрессовых условиях хранения.

Кроме того, были получены данные по длительной стабильности в течение 18 месяцев при предполагаемой температуре хранения ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$), а также в течение 9 месяцев в ускоренных условиях хранения ($25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{RH}$) и в течение трех месяцев в стрессовых условиях хранения ($40\pm 2^{\circ}\text{C}/75\pm 5\% \text{RH}$).

Для партии иллюстративного PCSK9-связывающего слитого белкового продукта данные для всех подвергнутых оценке параметров, включая параметры, указывающие на стабильность (icIEF, активность, CE-SDS и SEC-HPLC), в протоколе исследования стабильности находились в пределах критериев приемлемости в исследуемые моменты времени и при каждом условии хранения. Кроме того, в условиях длительного хранения не наблюдалось значительного увеличения количества агрегирующих или деградирующих соединений, а также снижения активности. Небольшое увеличение количества агрегатов (~1%) наблюдалось с помощью SEC-HPLC при всех условиях хранения, однако результаты находились в пределах приемлемых критериев для основного пика по данным SEC-HPLC, и никаких изменений активности не наблюдалось (в пределах вариабельности анализа). Также, небольшое увеличение количества фрагментов (до ~2%) наблюдалось при анализе CE-SDS в восстановительных условиях в условиях длительного хранения, но, опять же, соответствующее изменение активности не наблюдалось и может рассматриваться как находящееся в пределах вариабельности способа. Увеличение количества фрагментов по данным анализа CE-SDS в восстановительных и невосстановительных условиях коррелировало с увеличением времени и температуры (изменение до ~5% в стрессовых условиях). Колебания (до ~8%) соединений, соответствующих кислотным и главным пикам по данным icIEF, наблюдались в условиях длительного хранения, однако эти колебания находились в пределах изменчивости способа. Результаты icIEF в ускоренных и стрессовых условиях изначально указывали на потенциальную положительную тенденцию для кислотных соединений (до ~7%) и соответствующую отрицательную тенденцию для соединений, соответствующих главным пикам, хотя сопутствующего изменения активности не наблюдалось. Однако дополнительные временные точки указывают на то, что наблюдаемые небольшие изменения также могли быть колебаниями, связанными с изменчивостью метода. Невидимые частицы, по видимому, слегка колеблются во времени, но находятся в допустимых пределах (следует отметить, что атипичный результат наблюдался для частиц размером ≥ 2 мкм и ≥ 5 мкм через 9 месяцев как в длительных, так и в ускоренных условиях; однако количество частиц вернулось к ожидаемому уровню в моменты времени, соответствующие 12-месяцам и 18-месяцам). Никаких изменений во внешнем виде, физико-химических параметрах или активности не наблюдалось.

Кроме того, получали данные по долгосрочной стабильности для 12 месяцев при предполагаемой температуре хранения ($5^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$), а также для 12 месяцев в условиях ускоренного хранения ($25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\% \text{RH}$).

Для иллюстративной партии PCSK9-связывающего слитого белкового продукта данные для всех подвергнутых оценке параметров, включая параметры, указывающие на стабильность (icIEF, активность, CE-SDS и SEC-HPLC) в протоколе исследования стабильности, находились в пределах критериев приемлемости в исследуемые моменты времени и при каждом условии хранения. Кроме того, для условий длительного хранения не наблюдалось ни значительного увеличения количества агрегирующих или деградирующих соединений, ни снижения активности. Небольшое увеличение количества агрегатов (до ~1%) наблюдалось с помощью SEC-HPLC при обоих условиях хранения, однако результаты находились в пределах приемлемых критериев для главного пика с помощью SEC-HPLC, и никаких изменений активности не наблюдалось (в пределах вариабельности результатов анализа). Также, небольшое увеличение количества фрагментов при длительном хранении (до ~2%) и в стрессовых условиях хранения (~3%) наблюдалось с помощью CE-SDS в восстановительных условиях и с помощью CE-SDS в невосстановительных условиях в стрессовых условиях хранения (~3%), но, опять же, соответствующего изменения активности (в пределах вариабельности результатов анализа) не наблюдалось. Увеличение вариантов с кислотным зарядом (до ~5%) с сопутствующим уменьшением соединений, соответствующих главному пику, наблюдалось с помощью icIEF в обоих условиях хранения (что может быть связано с изменчивостью анализа, поскольку более поздние временные точки имели более низкий процент кислотных соединений). Никаких изменений во внешнем виде, физико-химических параметрах или активности не наблюдалось.

Пример 3. Первое исследование на людях.

LIB003 изучали в исследовании фазы 1 однократных нарастающих доз (Single Ascending Dose studies, SAD) с участием 63 субъектов в возрасте ≥ 18 и ≤ 70 лет, 24 женщин и 39 мужчин, 45 получали LIB003 и 18 плацебо, наблюдение проводили после введения дозы в течение по меньшей мере 43 дней. Исследо-

вание было плацебо-контролируемым и двойным слепым. В каждой из 9 когорт было 7 субъектов: 5 пациентов, получавших LIB-003, и 2 пациента, получавших плацебо, в результате 43 пациента получали LIB003 и 18 получали плацебо. Подкожные дозы LIB003 25 мг, 75 мг, 150 мг, 300 мг и 600 мг вводили здоровым субъектам, соблюдающим стабильную диету без гиполипидемической терапии и имеющим исходный уровень LDL-C ≥ 100 и ≥ 190 мг/дл. Дозы 150 мг и 300 мг также вводили подкожно (SC) пациентам, получавшим стабильную терапию статинами, имеющим исходный уровень LDL-C ≥ 100 мг/дл. Все субъекты имели TG ≥ 250 мг/дл. Две дополнительные когорты здоровых субъектов, не получающих гиполипидемическую терапию, с теми же критериями включения, касающимися липидов, как и когорты SC, получали LIB003 в дозе 300 мг и 600 мг внутривенно (IV).

Обзор результатов безопасности

Все 63 субъекта завершили исследование, при этом ни один из пациентов не выбыл или прекратил исследование раньше 43-го дня. В целом, LIB003 был безопасным и хорошо переносился после однократного подкожного (SC) и внутривенного (IV) введения здоровым субъектам и пациентам с гиперхолестеринемией, получающим терапию статинами.

Обзор результатов фармакодинамического анализа (эффективности)

Средние снижения свободного PCSK9 были быстрыми при всех дозах и достигали более 99% за 12 ч, и были устойчивыми практически у всех субъектов в течение по меньшей мере 3 недель (день 22) в когортах, не подвергающихся гиполипидемической терапии, получавших ≥ 150 мг LIB003. В то время как доза 300 мг LIB003 поддерживала подавление на 99% свободного PCSK9 в течение 29 дней, у субъектов, получавших дозу 150 мг, не подвергающихся гиполипидемической терапии, свободный PCSK9 снизился на 12%, а у тех, кто получал статины, на 54% от исходного уровня. Более низкие снижения свободного PCSK9 отразились на снижениях LDL-C и apo B, при этом более значительные снижения сохранялись у субъектов, не получавших гиполипидемическую терапию. Однако они не были устойчивыми через 4 недели (день 29) у пациентов, принимавших статины. Однократная доза 300 мг, как для не принимающих статины, так и для принимающих статины субъектов, обеспечила более стабильные и максимальные снижения свободного PCSK9, LDL-C и apo B. Кроме того, на основании предшествующих данных исследований с использованием моноклональных антител (mAb) можно предположить, что многократное дозирование приведет к более продолжительному подавлению свободного PCSK9 и снижению уровня LDL-C. Кроме того, обширные предшествующие данные показывают, что пациенты, получающие высокоинтенсивную терапию статинами, и пациенты с FH имеют более высокие исходные уровни PCSK9 и, вероятно, повышенный синтез PCSK9, и им потребуются дозы 300 мг или более высокие дозы, чтобы полностью подавить как свободный PCSK9, так и LDL-C в течение 4 недель. Обзор результатов фармакокинетического анализа C_{max} , AUC_{0-t} и AUC_{inf} для общего LIB003 после SC дозы увеличивались пропорционально дозе в диапазоне от 75 мг до 300 мг LIB003 и продемонстрировали незначительную супрадозовую пропорциональность в диапазоне 25-75 мг (4-5-кратное увеличение) и в диапазоне 300-600 мг (3-кратное увеличение). Аналогично, субъекты, получавшие лечение статинами, проявили дозопропорциональные увеличения общего LIB003 в диапазоне доз 150-300 мг, хотя воздействие общего LIB003 (AUC_{0-t} и AUC_{inf}) в целом было ниже, чем воздействия у субъектов, не получающих статины. Значения C_{max} , AUC_{0-t} и AUC_{inf} для общего LIB003, вводимого внутривенно (IV), увеличивались пропорционально дозе.

Медиана T_{max} общего LIB003 находилась в диапазоне от 72 до 168 ч (диапазон варьировался: 36-220 ч) для всех уровней SC дозы. T-HALF, CL/F и Vz/F также были сходными при всех тестируемых SC дозах, а также при введении LIB003 со статинами. Медиана T_{max} общего LIB003 изменялась от 0,33 до 1,08 ч для обоих уровней IV доз. T-HALF, CL и Vz были сходными для обеих тестируемых IV доз.

Абсолютная биодоступность общего LIB003 изменялась от 67 до 111% после однократных SC доз 300 мг и 600 мг LIB003, соответственно.

Обоснование уровней доз фазы 2 исследования

На основании данных по свободному уровню PCSK9 и LDL-C, полученных в фазе 1, и с целью достижения дозирования по меньшей мере один раз в четыре недели (Q4W) в объеме, который соответствует однократной подкожной (SC) инъекции с помощью автоинъектора ($\leq 1,5$ мл), планировалось исследование фазы 2 по подбору дозы у приблизительно 80 пациентов с ASCVD или высоким риском ASCVD, или HeFH без CVD, получавших стабильно статины и/или эзетимиб. Дозы, выбранные для дозирования Q4W в этом исследовании фазы 2 по подбору дозы, включали 150 мг, 300 мг и 350 мг. Предполагается, что все 3 дозы будут безопасными по причине отсутствия данных, касающихся воздействия LIB003 на человека в фазе 1 в дозе 600 мг как при подкожном, так и при внутривенном введении, а также уровней, достигнутых в 12-недельном токсикологическом GLP-исследовании у приматов, не относящихся к человеку.

Пример 4. Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование фазы 2 по подбору дозы для оценки эффективности и безопасности LIB003 у пациентов, получающих стабильную гиполипидемическую терапию, требующую дополнительного снижения уровня LDL-C.

LIB003 исследовали в 12-недельном двойном слепом рандомизированном плацебо-контролируемом

исследовании фазы 2 по подбору дозы, за которым следовал четырехнедельный период последующего наблюдения для оценки процентного изменения уровня LDL-C от исходного уровня в виде среднего значения для недель 10 и 12 и для недели 12, рассчитанного по формуле Фридвальда, с дозированием раз в месяц (Q4W) различных доз LIB003. В исследовании участвовали мужчины и женщины в возрасте ≥ 18 лет в количестве в общей сложности 81 человек, имеющих атеросклеротическое сердечно-сосудистое заболевание (ASCVD) или имеющих высокий риск ASCVD ($\geq 10\%$ 5-летний или $\geq 7,5\%$ 10-летний риск), и для субъектов, имеющих риск ASCVD или CVD, расчетный уровень LDL-C составил ≥ 80 мг/дл, или для субъектов с гетерозиготной семейной гиперхолестеролемией и без CVD расчетный уровень LDL-C составил ≥ 100 мг/дл. Все субъекты имели TG ≤ 400 мг/дл во время стабильной гиполипидемической пероральной терапии, такой как статины, с эзетимибом или без него. Эти субъекты были разделены на 3 группы активного лечения и 1 соответствующую группу лечения плацебо. В каждой группе было три субъекта, получавших LIB003, рандомизировали на каждый один субъект, получавший плацебо, т.е. 20 субъектов, получавших LIB003, на лечебную группу и 20, получавших плацебо). Подкожные дозы 150 мг, 300 мг или 350 мг LIB003 или плацебо вводили подкожно раз в месяц (Q4W) субъектам с гиперхолестеринемией, получавшим стабильную диету и пероральную снижающую уровень LDL-C лекарственную терапию.

Сводные демографические данные субъектов, включенных в это исследование, показаны в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Демографические данные когорт пациентов

Лечебная группа	Плацебо	LIB003 150 мг Q4W	LIB003 300 мг Q4W	LIB003 350 мг Q4W
Количество пациентов	N=20	N=21	N=19	N=21
Возраст: среднее количество лет (SD)	66.6 (7.4)	65 (13)	61.9 (10)	65.5 (7.1)
Пол: мужской/женский	10/10	12/9	10/9	6/15
Этническая принадлежность : Европеоидная раса/Афро-американцы	14/6	15/6	12/7	19/2
Средний BMI (кг/м ²) (SD)	29.6 (4.6)	31.1 (4.6)	29.6 (3.3)	29.4 (5.4)
Сердечно-сосудистое заболевание, N (%)	9 (45%)	10 (48%)	7 (37%)	10 (48%)
Сахарный диабет, N (%)	8 (40%)	11 (52%)	10 (53%)	10 (48%)
Текущий прием статинов, N (%)	16 (80%)	18 (86%)	12 (63%)	19 (91%)
Исходный уровень LDL-C* (среднее \pm SD) мг/дл	119.2 (34)	119.5 (37.5)	128.9 (39.3)	115.7 (30.5)
* Рассчитано по формуле Фридвальда				

Обзор результатов анализа безопасности

В целом, в этом исследовании LIB003 был безопасным и в целом хорошо переносился в виде под-

кожной дозы до 350 мг Q4W. Все дозы LIB003, 150 мг, 300 мг и 350 мг, хорошо переносились и не выявили каких-либо проблем, связанных с безопасностью. Из 81 субъекта 79 субъектов завершили исследование, а два субъекта прервали участие в исследовании. Прерывание участия в исследовании не было связано с побочными эффектами. Кроме того, в этом исследовании не было побочных эффектов, приведших к смерти.

Краткое описание нежелательных явлений, возникших после начала лечения (TEAE), испытываемых субъектами во время исследования, показано в таблице 12 ниже.

Таблица 12

TEAE, возникающие у субъектов во время исследования

Лечебная группа	Плацебо	LIB003 150 мг Q4W	LIB003 300 мг Q4W	LIB003 350 мг Q4W
Явления, возникающие после начала лечения (TEAE)	10 (50%)	9 (42,9%)	11 (58%)	13 (62%)
TEAE, связанные с лекарственным средством	2 (10%)	1 (4,3%)	1 (5,2%)	2 (9,5%)

В общей сложности 43 субъекта из 81 (53%) имели TEAE, при этом 10 из 20 (50%) получали плацебо, и 33 из 61 (54%) в объединенных группах, получавших LIB003. Большинство TEAE были легкой или средней степени тяжести. Чаще всего сообщаемые TEAE включали усталость, синяки в месте инъекции, инфекции верхних дыхательных путей и одышку. Все остальные TEAE сообщались ≤ 3 испытуемыми.

Только шесть субъектов из 81 (7%) имели связанные с исследуемым лекарственным средством TEAE, при этом два субъекта из 20 (10%) получали плацебо, и четыре из 61 (7%) в объединенных группах, получавших LIB003. Большинство связанных с исследуемым лекарственным средством TEAE были легкой степени тяжести; ни один из них не считался серьезным. Наиболее частым проявлением TEAE, связанного с исследуемым лекарственным средством, была эритема в месте инъекции. Обо всех других TEAE, связанных с исследуемым лекарственным средством, сообщили ≤ 1 субъекта.

Шесть субъектов из 81 (7%) имели серьезное нежелательное явление (SAE), один (5%) получал плацебо и пять (8%) в объединенных группах, получавших LIB003, ни один из них не считался связанным с исследуемым лекарственным средством. Пять серьезных нежелательных явлений (SAE), одно (5%) в группе плацебо и четыре (7%) в объединенных группах, получавших LIB003, были тяжелыми, а одно (2%) в группе, получавшей LIB003, было умеренным по интенсивности.

Не было выявлено TEAE, связанных с отклонениями от нормы лабораторных показателей. Не было клинически значимого увеличения или тенденций в тестах функции печени (ALT, AST или билирубин) в любой группе лечения или различий между группами, получавшими плацебо или LIB003. В частности, ни у одного субъекта не наблюдалось увеличения ALT или AST $>3 \times$ ULN, и ни у одного не было билирубина $>2 \times$ ULN. У ряда субъектов во всех группах лечения наблюдалось неустойчивое увеличение СК, которое было связано с физическими упражнениями или активностью, и ни одно из них не превышало $5 \times$ ULN. Не было клинически значимого увеличения или различий между группами лечения в отношении функции почек, глюкозы, других химических или гематологических параметров.

Не было обнаружено клинически значимых данных, касающихся показателей жизненно важных функций, ECG, и результатов физикального обследования. Всего было зарегистрировано пять случаев эритемы в месте инъекции через 15 мин после введения исследуемого лекарственного средства. Один субъект в группе плацебо также сообщил о зуде в месте инъекции через 15 мин после введения дозы в первый день. Все реакции в месте инъекции, которые возникали через 15 мин после введения дозы, имели легкую степень тяжести: одна в группе плацебо и 4 в объединенных группах, получавших LIB003.

Обзор результатов исследования эффективности

Все протестированные дозы LIB003, 150 мг, 300 мг и 350 мг, вызывали быстрое, устойчивое и значительное среднее снижение уровней LDL-C и свободного PCSK9. Наибольшее среднее снижение LDL-C наблюдалось в когорте, получавшей дозу 300 мг LIB003. Как и в предыдущих исследованиях, более высокая доза LIB003 в 350 мг не приводила к дальнейшему снижению LDL-C. Было обнаружено, что доза 150 мг недостаточна для достижения максимального снижения LDL-C для полных четырех недель между дозами.

Сводные данные по эффективности, полученные в ходе исследования, представлены в табл. 13 ниже.

Данные по эффективности

Лечебная группа	Плацебо	LIB003 150 мг Q4W	LIB003 300 мг Q4W	LIB003 350 мг Q4W
Среднее (SD) % изменение LDL-C на неделе 12*	7.3 (21.3)	-26.4 (24.1)	-71 (17.7)	-62.8 (19.5)
Среднее (SD) % изменение LDL-C на неделе 12 [‡]	5.7 (20.3)	-24.7 (25)	-66.2 (16.8)	-62.2 (16.7)
Алипопретеин В % изменение неделе 12	5.2 (13.2)	-22.4 (22.7)	-54.0 (16.0)	-53.0 (11.7)
Неделя 10/Неделя 12 LOCF [‡]				
LIB003 по сравнению с плацебо, среднее LS (SE)		-48.0 (5.37) ^Δ	-76.1 (5.51) ^Δ	-67.0 (5.37) ^Δ
95% CI		(-58.7, -37.3)	(-87.1, -65.1)	(-77.7, -56.3)
Неделя 12 LOCF [‡]				
LIB003 по сравнению с плацебо, среднее LS (SE)		-33.5 (6.80) ^Δ	-77.3 (6.97) ^Δ	-67.1 (6.80) ^Δ
95% CI		(-47.0, -19.9)	(-91.2, -63.5)	(-80.6, -53.6)
* Рассчитано по формуле Фридвальда				
‡ Путем ультрацентрифугирования				
‡ Сопервичная конечная точка (ANOVA)				
Δ p-значение <0,0001				

Наблюдалось большое устойчивое среднее снижение уровней LDL-C от исходного уровня до среднего изменения на 10-й и 12-й неделях LOCF и 12-й неделе LOCF, как рассчитано по формуле Фридвальда, после дозирования LIB003. Максимальное различие средних процентных изменений, определенное методом наименьших квадратов (LS) (95% CI), между когортами LIB003 и группой плацебо в LDL-C от исходного уровня до среднего уровня на 10-й и 12-й неделях LOCF и на 12-й неделе LOCF наблюдалось в когорте, получавшей LIB003 в дозе 300 мг, и составило -76,1% ([-86,0%, -66,2%], p<0,0001) и -77,3% ([-90,5%, -64,1%], p<0,0001) соответственно. Оценка среднего процентного изменения уровней LDL-C с помощью препаративного ультрацентрифугирования и формулы Хопкинса дала аналогичные результаты.

В соответствии с предыдущими исследованиями, показавшими, что после достижения максимального подавления PCSK9 дополнительного снижения LDL-C не происходит, более высокая доза 350 мг LIB003 не вызывала дополнительного снижения уровней LDL-C. Несмотря на то, что доза 150 мг обеспечивала такое же снижение, как и дозы 300 мг и 350 мг, каждые две недели после введения дозы, этого было недостаточно для поддержания максимального снижения LDL-C в течение полных четырех недель между дозами.

Наблюдалось большое устойчивое среднее снижение уровня свободного PCSK9 от исходного уровня до среднего значения на 10-й и 12-й неделе LOCF и на 12-й неделе LOCF после доз LIB003. Различия среднего процентного изменения LS (95% CI) между когортами LIB003 и группой плацебо в уровне свободного PCSK9 от исходного уровня до среднего значения на 10-й и 12-й неделях LOCF и на 12-й неделе LOCF наблюдалось в когортах, получавших 300 мг и 350 мг, которое составило -89,7% ([-100,0%, -79,4%], p<0,0001) и -92,8% ([-102,9%, -82,6%], p<0,0001), соответственно. Различия среднего процентного изменения LS (95% CI) между когортами LIB003 и группой плацебо в уровне свободного PCSK9 от исходного уровня до 12-й недели LOCF составило -84,1% ([-99,5%, -68,7%], p<0,0001) и -90,2% ([-105,4%, -75,0%], p<0,0001) для когорт, получавших 300 мг и 350 мг, соответственно. Хотя доза 350 мг LIB003 подавляла немного больше PCSK9, чем доза 300 мг на 12-й неделе (90,2% против 84,1%, соответственно), это не привело к большей эффективности в отношении LDL-C.

Кроме того, наблюдалось большое и устойчивое среднее увеличение общего уровня PCSK9 от исходного уровня до среднего значения на 10-й и 12-й неделе LOCF и на 12-й неделе LOCF после доз LIB003. Среднее процентное изменение от исходного уровня до среднего значения для недель 10-й и 12-й LOCF составило 95,555%, 90,273% и 90,080% для когорт, получавших LIB003 в дозах 150 мг, 300 мг и 350 мг соответственно. Среднее процентное изменение от исходного уровня до значения на 12-й неделе LOCF составило 75,165%, 78,188% и 86,811% для когорт, получавших LIB003 в дозах 150 мг, 300 мг и 350 мг, соответственно. Напротив, плацебо показало минимальное среднее процентное изменение ($\leq 3,044\%$) в те же моменты времени.

Кроме того, наблюдалось большое устойчивое среднее снижение уровней не-HDL-C и умеренное и устойчивое среднее снижение уровней TC от исходного уровня до среднего значения на 10-й и 12-й неделях LOCF и на 12-й неделе LOCF. Однако, как в когортах, получавших LIB003, так и в группе плацебо наблюдались лишь минимальные средние изменения уровней HDL-C от исходного уровня до среднего значения на 10-й и 12-й неделях LOCF и на 12-й неделе. Кроме того, сравнение процентного изменения уровней VLDL-C и TG между каждой когортой, получавшей LIB003, и группой плацебо с использованием модели ANOVA показало небольшое среднее снижение уровней VLDL-C и TG от исходного уровня до среднего значения на 10-й и 12-й неделях LOCF и на 12-й неделе LOCF.

Кроме того, наблюдалось значительное и устойчивое среднее снижение уровней apo B от исходного уровня до значения на 12-й неделе LOCF после доз LIB003. Максимальное различие среднего процентного изменения LS (95% CI) между когортами, получавшими LIB003, и группой плацебо для apo B возникло для когорты, получавшей 300 мг, и составило -58,4% ([-68,9%, -48,0%], $p < 0,0001$).

Более того, наблюдалось умеренное и устойчивое снижение уровня Lp(a) от исходного уровня до 12-й недели LOCF после всех доз LIB003. Максимальное различие среднего процентного изменения LS (95% CI) между когортами, получавшими LIB003, и группой плацебо в Lp(a) возникло для когорты, получавшей 300 мг, и составило -28,7% ([-42,6%, -14,8%], $p < 0,0001$). Это снижение согласуется с уменьшением, достигнутым с помощью моноклональных антител против PCSK9 при эквивалентных дозах и частоте дозирования, которые подавляли свободный PCSK9 и LDL-C аналогично LIB003 в дозе 300 мг Q4W.

Уровни apo A1 показали минимальное среднее изменение от исходного уровня до 12-й недели LOCF для когорт, получавших LIB003, и группы плацебо.

На основании данных, полученных в фазе 2 исследования, обсуждаемого выше, доза LIB003, равная 300 мг, вводимая подкожно Q4W, была выбрана для открытого расширенного исследования 3 фазы.

Последовательности.

PCSK9-СВЯЗЫВАЮЩИЙ МОТИВ

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA
TISGLKPGVDYITITVYAVEFDFFGAGYYHRPISINYRTE (SEQ ID NO: 1)

АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ HSA

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTECC
QAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPK
AEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEK
LLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRH
PDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCSELF
EQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAED
YLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTF
HADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKE
TCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 2)

PCSK9-СВЯЗЫВАЮЩИЙ СЛИТЫЙ БЕЛОК

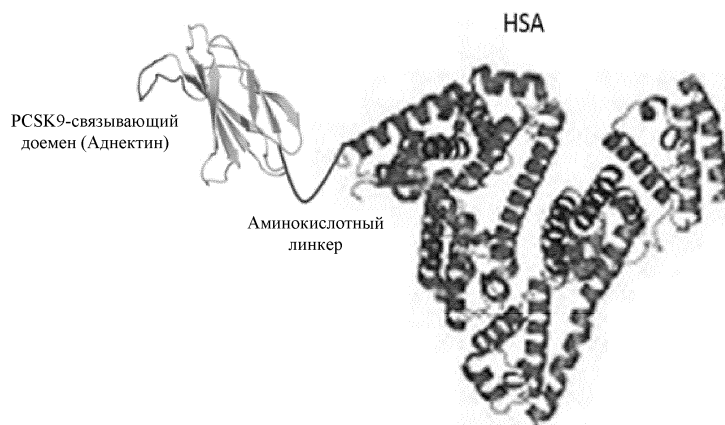
VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVSKGTA
TISGLKPGVDYITITVYAVEFDFFGAGYYHRPISINYRTEGSGSGSDAHKSEVAHRFKD
LGEENFKALVLIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTL
GDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPRLVRPEVDVMCT
AFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKL
DELDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDL
TKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKT
YETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCSELFQGEYKFNALLV
RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE
KTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIK
KQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAAS
QAALGL (SEQ ID NO: 3).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая одну или более стандартных доз PCSK9-связывающего слитого белка, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где стандартная доза содержит от около 250 мг до около 350 мг PCSK9-связывающего слитого белка, составленного в концентрации по меньшей мере 200 мг/мл; и фармацевтически приемлемый носитель.
2. Композиция по п.1, содержащая по меньшей мере около 250 мг/мл PCSK9-связывающего слитого белка.
3. Композиция по п.1, содержащая по меньшей мере около 300 мг/мл PCSK9-связывающего слитого белка.
4. Композиция по п.1, содержащая стандартную дозу от около 275 мг до около 325 мг PCSK9-связывающего слитого белка.
5. Композиция по п.4, содержащая стандартную дозу около 300 мг PCSK9-связывающего слитого белка.
6. Композиция по любому из пп.1-5, в которой фармацевтически приемлемый носитель содержит буферный агент, изотонический агент, необязательно поверхностно-активное вещество (ПАВ) и растворитель.
7. Композиция по п.6, где буферный агент представляет собой аминокислотный буфер, цитратный

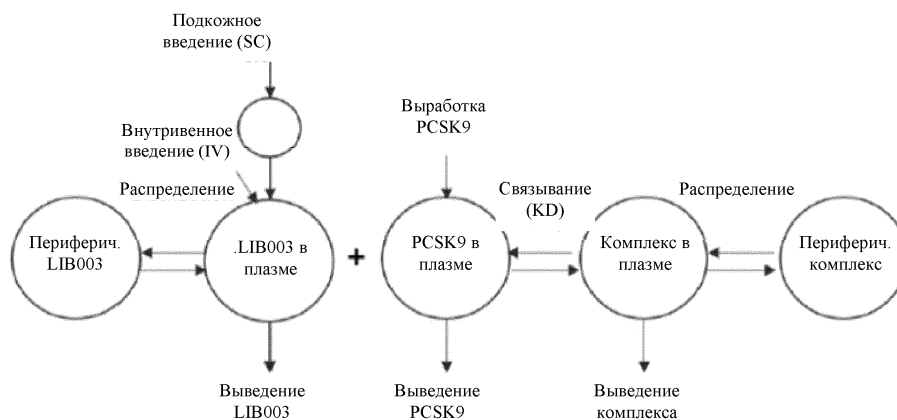
- буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер, сукцинатный буфер и/или бикарбонатный буфер.
8. Композиция по п.6 или 7, где буферный агент содержит L-гистидин/L-гистидина моногидрохлорид.
 9. Композиция по любому из пп.6-8, в которой изотонический агент содержит один или несколько из хлорида натрия, декстрозы, сахарозы, глицерина, маннита, сорбита, аргинина или хлорида калия.
 10. Композиция по п.9, в которой изотонический агент представляет собой хлорид натрия.
 11. Композиция по любому из пп.6-10, в которой поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбатное ПАВ.
 12. Композиция по п.11, в которой поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-80.
 13. Композиция по любому из пп.6-10, отличающаяся тем, что композиция не содержит поверхностно-активное вещество.
 14. Композиция по любому из пп.6-13, в которой растворитель представляет собой воду.
 15. Композиция по любому из пп.1-14, дополнительно содержащая консервант, необязательно выбранный из фенола, метакрезола и бензоата натрия.
 16. Композиция по любому из пп.1-15, где PCSK9-связывающий слитый белок содержит от 1 до 10 аминокислотных замен, вставок и/или делеций.
 17. Композиция по любому из пп.1-16, отличающаяся тем, что композиция содержится в шприце-ручке, шприце или автоинъекторе.
 18. Композиция по п.17, где шприц-ручка, шприц или автоинъектор содержит или доставляет стандартную дозу от около 250 мг до около 350 мг PCSK9-связывающего слитого белка.
 19. Композиция по п.18, где шприц-ручка, шприц или автоинъектор содержит и доставляет стандартную дозу от около 275 мг до около 300 мг PCSK9-связывающего слитого белка.
 20. Композиция по п.19, где шприц-ручка, шприц или автоинъектор содержит и доставляет стандартную дозу около 300 мг PCSK9-связывающего слитого белка.
 21. Композиция по любому из пп.18-20, отличающаяся тем, что стандартные дозы имеют объем не более чем около 1,5 мл или не более чем около 1 мл.
 22. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что стандартные дозы имеют объем не более 0,8 мл.
 23. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что стандартные дозы имеют объем не более чем около 0,25 мл.
 24. Композиция по пп.17-23, где шприц-ручка, шприц или автоинъектор содержит от 1 до 10 стандартных доз.
 25. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну стандартную дозу PCSK9-связывающего слитого белка, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где стандартная доза содержит от около 250 мг до около 350 мг PCSK9-связывающего слитого белка, составленного в концентрации по меньшей мере 200 мг/мл; и фармацевтически приемлемый носитель, содержащий от около 1 мг/мл до около 10 мг/мл L-гистидина/L-гистидина моногидрохлорида, поддерживающего pH около 6,8, и от около 6 мг/мл до около 12 мг/мл хлорида натрия.
 26. Способ лечения нарушения, связанного с PCSK9, включающий введение композиции по любому из пп.1-25 субъекту, нуждающемуся в этом.
 27. Способ по п.26, отличающийся тем, что субъектом является человек, имеющий состояние, выбранное из расстройства липидного обмена, гиперхолестеринемии, дислипидемии, ишемической болезни сердца, атеросклероза, высокого кровяного давления, сахарного диабета 2 типа и холестатического заболевания печени.
 28. Способ по п.27, отличающийся тем, что у субъекта имеется гиперхолестеринемия.
 29. Способ по п.27, отличающийся тем, что у субъекта имеется семейная гиперхолестеринемия.
 30. Способ по п.27, отличающийся тем, что субъект имеет атеросклеротическое сердечно-сосудистое заболевание (ASCVD) или высокий риск (ASCVD).
 31. Способ по любому из пп.26-30, отличающийся тем, что субъект не получает терапию статинами или не получает гиполипидемическую пероральную терапию.
 32. Способ по любому из пп.26-30, отличающийся тем, что субъект получает терапию статином или гиполипидемическую пероральную терапию.
 33. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъект имеет непереносимость статинов.
 34. Способ по любому из пп.26-33, в котором композицию вводят путем подкожного, внутримышечного, внутрикожного или внутривенного введения.
 35. Способ по любому из пп.26-34, в котором субъект получает стандартную дозу композиции от одного раза в неделю до одного раза в два месяца.
 36. Способ по п.35, в котором субъект получает стандартную дозу композиции примерно один раз в месяц или примерно раз в 4 недели.
 37. Способ по п.35, в котором стандартная доза имеет объем от 0,7 мл до 1,5 мл.
 38. Способ по п.35, в котором субъект получает стандартную дозу композиции примерно один раз в неделю.
 39. Способ по п.38, в котором стандартная доза имеет объем от около 0,05 мл до около 0,25 мл.

40. Способ лечения нарушения, связанного с PCSK9, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или более стандартных доз PCSK9-связывающего слитого белка, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где стандартная доза содержит от около 250 мг до около 350 мг PCSK9-связывающего слитого белка, составленного в концентрации по меньшей мере 200 мг/мл; и фармацевтически приемлемого носителя, содержащего от около 1 мг/мл до около 10 мг/мл L-гистидина/L-гистидина моногидрохлорида, поддерживающего рН около 6,8, и от около 6 мг/мл до около 12 мг/мл хлорида натрия, где одну или более стандартных доз вводят подкожно примерно каждые 4 недели.

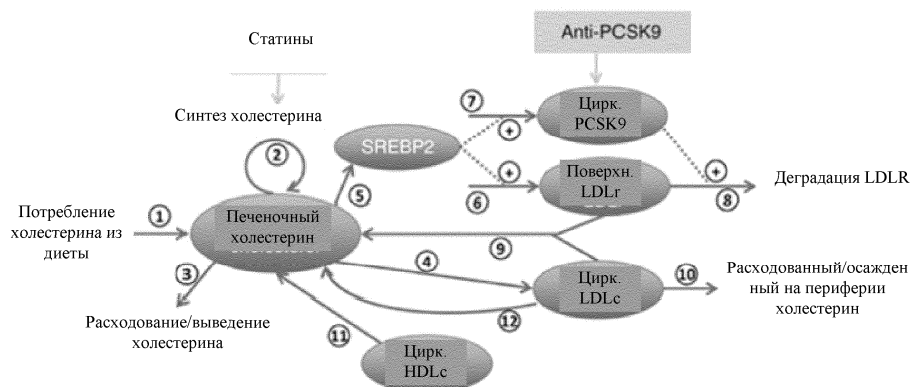


HSA = человеческий сывороточный альбумин; PCSK9 = пропротеинконвертаза субтилизин/кексин типа 9

Фиг. 1



Фиг. 2A



Фиг. 2B



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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