

DOMENIUL INVENTIEI

Prezenta invenția se referă la utilizarea inhibitorilor ANGPTL3 pentru a reduce progresia aterosclerozei.

STADIUL TEHNICII

Ateroscleroza este un sindrom care afectează vasele arteriale. Ateroscleroza rezultă dintr-un răspuns inflamator cronic în pereții arteriali și este o cauză majoră de deces și morbiditate cardiovasculară. Ateroscleroza implică îngroșarea pereților arterelor și se caracterizează prin dezvoltarea plăcii arteriale și eventuala restricție sau blocare a fluxului sanguin. Tratamentele actuale pentru ateroscleroză includ modificări ale dietei și ale stilului de viață {de ex. renunțarea la fumat), intervenție farmaceutica (de exemplu, statine, anticoagulante, etc.) și intervenții chirurgicale (de exemplu, angioplastie, stenturi, by-pass, etc.). Evaluarea directă a eficacității intervențiilor farmaceutice asupra dezvoltării aterosclerozei la subiecții umani este problematică din cauza dificultății în detectarea și măsurarea cu acuratețe a plăcii și a leziunilor arteriale la subiecții vii. Modelele animale de ateroscleroză sunt, prin urmare, foarte utile pentru dezvoltarea și testarea de noi tratamente terapeutice pentru ateroscleroză.

Sunt necesare noi metode pentru tratamentul, prevenirea sau ameliorarea aterosclerozei în domeniu.

WO 2012/174178 dezvăluie un anticorp complet uman al unui fragment de legare la antigen al unui anticorp uman care se leagă în mod specific și inhibă sau interferează cu cel puțin o activitate a proteinei 3 asemănătoare angiopoietinei umane (hANGPTL3). WO 2011/085271 dezvăluie metode de compuși și compoziții pentru reducerea expresiei unui ARNm ANGPTL3 și a unei proteine la un animal.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

Orice referințe din descriere la metode de tratament se referă la compuși, compoziții farmaceutice și medicamente conform prezentei invenții pentru utilizare într-o metodă de tratare a corpului uman (sau animal) prin terapie. Prezenta invenție furnizează un inhibitor al proteinei 3 asemănătoare angiopoietinei (ANGPTL3) pentru utilizare într-o metodă de reducere a progresia aterosclerozei la un subiect, metoda cuprinzând selectarea unui subiect care are ateroscleroză și administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor

ANGPTL3 la subiect, în care inhibitorul ANGPTL3 este un anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen care leagă în mod specific ANGPTL3 care cuprinde amino CDR cu lanț greu și ușor secvențe de acid având SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8 și 9. Metodele terapeutice pot duce la o reducere a aterosclerozei formarea plăcii și a leziunilor aterosclerotice la subiecții care au nevoie de acestea. Metodele sunt utile și pentru reducerea colesterol total seric, colesterol LDL și trigliceride la un subiect și pentru tratarea bolilor și tulburărilor care sunt tratabil printr-o reducere a unuia sau mai multor colesterol total, colesterol LDL și/sau trigliceride.

Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, subiectul, înainte sau în momentul inițierii tratamentului cu una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3, este diagnosticat cu hipercolesterolemie familială heterozigotă (HeFH) sau hipercolesterolemie familială homozigotă (HoFH), și/sau lipoproteina (a) crescută (Lp[a]). Prezenta invenție include, de asemenea, metode pentru tratarea, prevenirea sau atenuarea aterosclerozei la un subiect care are hipercolesterolemie care nu este de natură familială (adică, hipercolesterolemie non-familială). Subiecții care pot fi tratați prin metodele prezentei invenții, în anumite variante de realizare, includ acei subiecți care au sau sunt diagnosticați cu boală cardiovasculară (de exemplu, boală cardiovasculară aterosclerotică). În anumite variante de realizare, subiectul care poate fi tratat prin metodele prezentei invenții este un subiect care a suferit un accident vascular cerebral sau un infarct miocardic.

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, inhibitorul ANGPTL3 este administrat pacientului ca terapie suplimentară la terapia de modificare a lipidelor existentă a pacientului (de exemplu, pe partea superioară a terapiei de bază cu statine a pacientului).

Alte exemple de realizare ale prezentei invenții vor deveni evidente dintr-o trecere în revistă a descrierii detaliate care urmează.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 este o diagramă de flux de studiu care ilustrează procedurile, administrările și măsurătorile efectuate pe animale pe parcursul studiului descris în Exemplul 2 de aici.

Figurile 2A și 2B arată nivelurile de colesterol ale animalelor din diferitele grupuri de tratament (pătrate închise tratate martor [■]; sau cercuri închise tratate cu evinacumab [●])

●]) la diferite momente de timp pe parcursul studiului descris în exemplul 2 aici. **Figura 2A** prezintă nivelurile medii de colesterol (mM) în timp (în săptămâni). **Figura 2B** prezintă expunerea totală la colesterol (mM x săptămâni) în săptămâna 13.

Figura 3 prezintă nivelurile de trigliceride (mM) ale animalelor din diferitele grupuri de tratament (pătrate închise tratate martor [■]; sau cercuri închise tratate cu evinacumab [●]) la diferite momente de-a lungul studiului descris în exemplul 2 de aici.

Figurile 4A, 4B și 4C arată profilurile lipoproteinelor de colesterol (mM, după separarea lipoproteinelor) ale animalelor din diferitele grupuri de tratament (pătrate închise tratate martor [■]; sau cercuri închise tratate cu evinacumab [●]) la momente diferite. puncte pe parcursul studiului descris în Exemplul 2 de aici. Lipoproteinele au fost separate pe o coloană Superose, iar valorile prezentate sunt valori absolute din măsurătorile de colesterol în plasmă combinată per grup la diferitele momente indicate. **Figura 4A** prezintă nivelurile de colesterol din diferite fracțiuni de plasmă extrase la momentul = 0 al studiului. **Figura 4B** prezintă nivelurile de colesterol din diferite fracțiuni de plasmă extrase la momentul = 6 săptămâni de studiu. **Figura 4C** prezintă nivelurile de colesterol din diferite fracțiuni de plasmă extrase la momentul = 13 săptămâni de studiu.

Figurile 5A, 5B și 5C arată profilurile lipoproteinelor trigliceridelor (mM, după separarea lipoproteinelor) ale animalelor din diferitele grupuri de tratament (pătrate închise tratate martor [■]; sau cercuri închise tratate cu evinacumab [●]) la momente diferite. puncte pe parcursul studiului descris în Exemplul 2 de aici. Lipoproteinele au fost separate pe o coloană Superose, iar valorile prezentate sunt valori absolute din măsurătorile trigliceridelor în plasmă combinată per grup la diferitele momente indicate. **Figura 5A** prezintă nivelurile de trigliceride din diferite fracțiuni de plasmă extrase la momentul = 0 al studiului. **Figura 5B** prezintă nivelurile de trigliceride din diferite fracțiuni de plasmă extrase la momentul = 6 săptămâni de studiu. **Figura 5C** prezintă nivelurile de trigliceride din diferite fracțiuni de plasmă extrase la momentul = 13 săptămâni de studiu.

Figurile 6A și 6B arată zona leziunii aterosclerotice a animalelor din diferitele grupuri de tratament (tratate martor, bară deschisă sau cercuri; sau tratate cu evinacumab, bară închisă sau cercuri) în săptămâna 13 a studiului descris în Exemplul 2 de aici. **Figura 6A** prezintă aria medie a leziunii aterosclerotice pe secțiune transversală ($\times 1000 \mu\text{m}^2$) pentru diferitele grupuri de tratament. **Figura 6B** este un grafic de dispersie a ariei totale a

leziunii, care arată aria leziunii aterosclerotice pe secțiune transversală ($\times 1000 \mu\text{m}^2$) pentru animale individuale din diferitele grupuri de tratament.

Figurile 7A și 7B arată conținutul mediu necrotic al secțiunilor transversale din leziuni aterosclerotice, clasificate ca tip IV sau tip V, observate la animale din diferitele grupuri de tratament (tratament martor, bar deschis; sau tratat cu evinacumab, bar închis) în săptămâna 13 a studiului descris în Exemplul 2 de aici. **Figura 7A** arată valoarea absolută ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) a ariei necrotice pe secțiune transversală. **Figura 7B** prezintă valorile relative (procentul suprafeței leziunii) ale conținutului necrotic al leziunilor.

DESCRIERE DETALIATA

Înainte ca prezenta invenție să fie descrisă, trebuie să se înțeleagă că această invenție nu este limitată la anumite metode și condiții experimentale descrise, deoarece astfel de metode și condiții pot varia. De asemenea, trebuie înțeles că terminologia utilizată aici are doar scopul de a descrie exemple de realizare particulare și nu se intenționează să fie limitativă, deoarece scopul prezentei invenții va fi limitat doar de revendicările anexate. Dacă nu este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțeleg în mod obișnuit de către o persoană cu calificare obișnuită în domeniul căruia îi aparține această invenție. Așa cum este utilizat aici, termenul "aproximativ", atunci când este utilizat cu referire la o anumită valoare numerică citată, înseamnă că valoarea poate varia de la valoarea indicată cu nu mai mult de 1 %. De exemplu, așa cum este utilizată aici, expresia „aproximativ 100” include 99 și 101 și toate valorile dintre acestea (de exemplu, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 etc.).

Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practica prezentei invenții, metodele și materialele preferate sunt acum descrise.

Metode de prevenire sau atenuare a aterosclerozei

Prezenta invenție se referă, în general, la utilizarea unui inhibitor al proteinei-3 asemănător angiopoietinei (ANGPTL3) așa cum este definit în revendicările pentru reducerea progresiei aterosclerozei la un subiect. Un inhibitor al proteinei-3 asemănător angiopoietinei (ANGPTL3) așa cum este definit în revendicări este utilizat în una sau mai

multe doze. Conform anumitor variante de realizare, utilizarea unui inhibitor al proteinei-3 asemănătoare angiopoietinei (ANGPTL3) așa cum este definit în revendicări are ca rezultat o reducere a formării plăcii aterosclerotice la un subiect. De exemplu, utilizarea unui inhibitor al proteinei-3 asemănătoare angiopoietinei (ANGPTL3) așa cum este definit în revendicări poate avea ca rezultat una sau mai multe dintre o reducere a zonei leziunii aterosclerotice și/sau o reducere a zonei necrotice a leziunilor aterosclerotice la un subiect.

Selectarea pacientului

Conform prezentei invenții, subiecții care pot fi tratați prin metodele sunt subiecți care au sau sunt diagnosticați cu ateroscleroză. În consecință, metodele includ selectarea unui subiect care are ateroscleroză, și administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor al proteinei-3 asemănător angiopoietinei (ANGPTL3) la subiect.

Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele este un subiect care, înainte de sau la momentul inițierii tratamentului cu una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3, este diagnosticat cu hipercolesterolemie familială heterozigotă (HeFH), hipercolesterolemie familială homozigotă (HoFH), lipoproteina(a) crescută (Lp[a]), hipercolesterolemie autosomal dominantă (ADH, de exemplu, ADH asociată cu una sau mai multe mutații de creștere a funcției în gena LDLR), gena ApoB și/sau gena PCSK9), hipercolesterolemia autozomal recesiv (ARH, de exemplu, ARH asociată cu mutații în LDLRAP1), precum și incidența hipercolesterolemiei care sunt distincte de Hipercolesterolemia familială (nonFH). Diagnosticul hipercolesterolemiei familiale (de exemplu, heFH sau hoFH) poate fi făcut prin genotipizare și/sau criterii clinice. Pentru pacienții care nu sunt genotipați, diagnosticul clinic se poate baza fie pe criteriile Simon Broome cu un criteriu pentru HF definită, fie pe criteriile OMS/Dutch Lipid Network cu un scor > 8 puncte.

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției este un subiect care este diagnosticat cu boală cardiovasculară (CVD) înainte sau în momentul inițierii tratamentului cu una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3. Subiectul poate fi, de asemenea, selectat pe baza unui istoric de boală coronariană (CHD). Așa cum este utilizat aici, un „istoric de CHD” (sau „istoric documentat de CHD”) include unul sau mai multe dintre: (i) infarct miocardic acut (MI); (ii)

tăcut MI; (iii) angină instabilă; (iv) procedura de revascularizare coronariană (de exemplu, intervenție coronariană percutanată [PCI] sau chirurgie de grefă de bypass coronarian [CABG]); și/sau (v) CHD semnificativă clinic diagnosticată prin teste invazive sau neinvazive (cum ar fi angiografia coronariană, testul de stres folosind banda de alergare, ecocardiografia de stres sau imagistica nucleară).

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției poate fi selectat pe baza faptului că are boală cardiacă non-coronariană boală cardiovasculară ("non-CHD CVD"). Așa cum este utilizat aici, „CVD non-CHD” include unul sau mai multe dintre: (i) accident vascular cerebral ischemic anterior documentat cu un deficit neurologic ischemic focal care a persistat mai mult de 24 de ore, considerat ca fiind de origine aterotrombotică; (ii) boala arterială periferică; (iii) anevrism de aortă abdominală; (iv) stenoza arterei renale aterosclerotice; și/sau (v) boala arterei carotide (atacuri ischemice tranzitorii sau >50% obstrucția unei artere carotide).

Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției poate fi selectat pe baza unuia sau mai multor factori de risc suplimentari, cum ar fi, de exemplu, (i) boala renală cronică moderată (CKD) documentată. așa cum este definit de $30 \leq \text{eGFR} < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ timp de 3 luni sau mai mult; (ii) diabet zaharat de tip 1 sau tip 2 cu sau fără afectare a organului țintă {de exemplu, retinopatie, nefropatie, microalbuminurie}; și/sau (iii) un SCORE de risc de BCV fatal pe 10 ani calculat $\geq 5\%$ (Orientările ESC/EAS pentru managementul dislipidemiilor, Conroy și colab., 2003, Eur. Heart J. 24:987-1003).

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției poate fi selectat pe baza unuia sau mai multor factori de risc suplimentari selectați din grupul constând din vârstă {de exemplu, mai în vârstă de 40, 45 de ani, 50, 55, 60, 65, 70, 75 sau 80 de ani}, rasă, origine națională, sex (bărbat sau femeie), obiceiuri de exerciții fizice {de exemplu, persoană fizică obișnuită, fără exerciții fizice}, alte afecțiuni medicale preexistente {de exemplu, tip -II diabet, hipertensiune arterială etc.) și starea medicației curente {de exemplu, luați în prezent beta-blocante, niacină, ezetimib, fibrați, acizi grași omega-3, rășini de acizi biliari etc.).

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele din invenție prezintă un nivel ridicat de unul sau mai mulți markeri

inflamatori. Orice marker al inflamației sistemice poate fi utilizat în scopurile prezentei invenții. Markerii inflamatori adecvați includ, fără limitare, proteina C-reactivă, citokine (de exemplu, IL-6, IL-8 și/sau IL-17) și molecule de adeziune celulară (de exemplu, ICAM-1, ICAM-3, BL-CAM, LFA-2, VCAM-1, NCAM și PECAM).

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției poate fi selectat pe baza unei combinații a unuia sau mai multor criterii de selecție sau caracteristici terapeutice de mai sus. De exemplu, în conformitate cu anumite exemple de realizare, un subiect adecvat pentru tratamentul cu metodele prezentei invenții poate fi selectat suplimentar pe baza faptului că are heFH sau non-FH în combinație cu: (i) antecedente de CHD documentate, (ii) CVD non-CHD și/sau (iii) diabet zaharat cu afectare a organului țintă; astfel de pacienți pot fi selectați și pe baza unei concentrații serice de LDL-C mai mare sau egală cu 70 mg/dL.

Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției are hipercolesterolemie care nu este controlată în mod adecvat printr-un regim zilnic de statine terapeutice cu doze moderate și poate fi selectat în plus pe baza faptului că are heFH sau nu. -FH fără CHD, sau non-CHD CVD, dar având fie (i) un SCORE de risc de CVD fatal calculat la 10 ani $\geq 5\%$; sau (ii) diabet zaharat fără afectarea organului țintă; astfel de subiecți pot fi selectați și pe baza faptului că au un LDL-C seric concentrație mai mare sau egală cu 100 mg/dL.

Conform anumitor realizări ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției este un subiect care are sindrom de chilomicronemie familială (FCS; cunoscut și sub denumirea de deficit de lipoprotein lipază).

Conform anumitor variante de realizare ale prezentei invenții, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției este un subiect care suferă sau a suferit recent afereză lipoproteinică (de exemplu, în ultimele șase luni, în ultimele 12 săptămâni, în ultimele 8 săptămâni, în ultimele 6 săptămâni, în ultimele 4 săptămâni, în ultimele 2 săptămâni etc.).

Administrarea unui inhibitor ANGPTL3 ca terapie suplimentară

Prezenta invenție include metode de prevenire sau atenuare a aterosclerozei la un subiect, în care subiectului i se administrează un inhibitor ANGPTL3 în conformitate cu o anumită cantitate și o frecvență de dozare și în care inhibitorul ANGPTL3 este administrat ca supliment la terapia de modificare a lipidelor preexistentă a pacientului. (LMT), cum ar

fi un supliment la regimul terapeutic zilnic preexistent al pacientului cu statine. (Regime de statine terapeutice zilnice specifice, exemplificative la care se poate adăuga un inhibitor ANGPTL3 sunt descrise în altă parte aici).

De exemplu, metodele prezentei invenții includ regimuri terapeutice suplimentare în care inhibitorul ANGPTL3 este administrat ca terapie suplimentară la aceeași schemă terapeutică zilnică stabilă cu statine (adică aceeași cantitate de dozare de statină) pe care pacientul a urmat-o înainte de primind inhibitorul ANGPTL3. În alte variante de realizare, inhibitorul ANGPTL3 este administrat ca terapie suplimentară la un regim terapeutic de statine care cuprinde o statină într-o cantitate care este mai mare sau mai mică decât doza de colorare la care a fost pacientul înainte de a primi inhibitorul ANGPTL3. De exemplu, după începerea unui regim terapeutic care cuprinde un inhibitor ANGPTL3 administrat la o anumită frecvență și cantitate de dozare, doza zilnică de statină administrată sau prescrisă pacientului poate (a) să rămână aceeași, (b) să crească sau (c) să scadă {de exemplu, titrare crescătoare sau titrate scăzută} în comparație cu doza zilnică de statină pe care o lua pacientul înainte de a începe regimul terapeutic cu inhibitor ANGPTL3, în funcție de nevoile terapeutice ale pacientului.

Eficacitatea terapeutică

Metodele au ca rezultat o reducere a formării plăcii aterosclerotice în arterele unui subiect și/sau prevenirea progresiei aterosclerozei la un subiect. De exemplu, metodele sunt utile pentru limitarea sau reducerea ariei leziunii aterosclerotice și/sau zonei centrale necrotice în leziunile aterosclerotice la un subiect.

Metodele pot duce în plus la reducerea nivelurilor serice ale uneia sau mai multor componente lipidice selectate din grupul constând din LDL-C, ApoB100, non-HDL-C, colesterol total, VLDL-C, trigliceride, Lp(a) și colesterolul rămas. De exemplu, în conformitate cu anumite exemple de realizare ale prezentei invenții, administrarea unei compoziții farmaceutice care cuprinde un inhibitor ANGPTL3 la un subiect adecvat va avea ca rezultat o reducere medie procentuală față de valoarea inițială a colesterolului seric cu lipoproteine cu densitate joasă (LDL-C) de cel puțin aproximativ 25. %, 30%, 40%, 50%, 60% sau mai mult; o reducere medie procentuală față de valoarea inițială în ApoB100 de cel puțin aproximativ 25%, 30%, 40%, 50%, 60% sau mai mare; o reducere medie procentuală față de valoarea inițială a non-HDL-C de cel puțin aproximativ 25%,

30%, 40%, 50%, 60% sau mai mare; o reducere medie procentuală față de valoarea inițială a colesterolului total de cel puțin aproximativ 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% sau mai mare; o reducere medie procentuală față de valoarea inițială a VLDL-C de cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% sau mai mare; o reducere medie procentuală față de valoarea inițială a trigliceridelor de cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% sau mai mare; și/sau o reducere procentuală medie față de valoarea inițială a Lp(a) de cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25% sau mai mare.

Inhibitori ANGPTL3

Metodele prezentei invenții cuprind administrarea unui pacient a unei compoziții terapeutice care cuprinde un inhibitor ANGPTL3. În contextul prezentei invenții, inhibitorii ANPTL3 sunt anticorpi anti-ANGPTL3 sau fragmente de anticorpi care leagă antigenul care leagă în mod specific ANGPTL3 uman care cuprind secvențe de aminoacizi CDR cu lanț greu și ușor având SEQ ID NR:4, 5, 6, 7, 8, și 9.

Termenul „proteină-3 asemănătoare angiopoietinei umane” sau „ANGPTL3 uman” sau „hANGPTL3”, așa cum este utilizat aici, se referă la ANGPTL3 având secvența de aminoacizi a SEQ ID NR:1 (vezi, de asemenea, NCBI Accession NP 055310), sau un fragment biologic activ al acestuia.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, se referă la molecule de imunoglobulină cuprinzând patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare (L) interconectate prin legături disulfură, precum și multimeri ai acestora {de exemplu, IgM} . Fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (abreviată aici ca HCVR sau V_H) și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunea constantă a lanțului greu cuprinde trei domenii, C_H1, C_H2 și C_H3. Fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviată aici ca LCVR sau V_L) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor cuprinde un domeniu (C_L1). Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, numite regiuni de determinare a complementarității (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, numite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L este compus din trei CDR-uri și patru FR-uri, aranjate de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. În diferite realizări ale invenției, FR-urile anticorpului anti-ANGPTL3 (sau porțiunea de legare a antigenului a acestuia) pot fi identice cu secvențele liniei germinale

umane sau pot fi modificate în mod natural sau artificial. O secvență consens de aminoacizi poate fi definită pe baza unei analize alăturate a două sau mai multe CDR-uri. Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, include, de asemenea, fragmente de legare la antigen ale moleculelor de anticorp complet. Termenii „porțiune de legare la antigen” a unui anticorp, „fragment de legare la antigen” a unui anticorp și altele asemenea, așa cum sunt utilizate aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care se leagă în mod specific la o polipeptidă naturală, obținută enzimatic, sintetică sau modificată genetic antigenul pentru a forma un complex. Fragmentele de legare la antigen ale unui anticorp pot fi derivate, de exemplu, din molecule de anticorp complet folosind orice tehnici standard adecvate, cum ar fi digestia proteolitică sau tehnici de inginerie genetică recombinată care implică manipularea și exprimarea ADN-ului care codifică domenii variabile și opțional constante ale anticorpului. Un astfel de ADN este cunoscut și/sau este ușor disponibil din, de exemplu, surse comerciale, biblioteci de ADN (inclusiv, de exemplu, biblioteci de anticorpi fagi) sau poate fi sintetizat. ADN-ul poate fi secvențiat și manipulat chimic sau prin utilizarea tehnicilor de biologie moleculară, de exemplu, pentru a aranja unul sau mai multe domenii variabile și/sau constante într-o configurație adecvată sau pentru a introduce codoni, a crea resturi de cisteină, a modifica, adăuga sau șterge aminoacizi, etc.

Exemple nelimitative de fragmente de legare la antigen includ: (i) fragmente Fab; (ii) fragmente F(ab')₂; (iii) fragmente Fd; (iv) fragmente Fv; (v) molecule Fv (scFv) cu catenă unică; (vi) fragmente dAb; și (vii) unități minime de recunoaștere constând din resturile de aminoacizi care imită regiunea hipervariabilă a unui anticorp {de exemplu, o regiune izolată de determinare a complementarității (CDR) cum ar fi o peptidă CDR3} sau o peptidă FR3-CDR3-FR4 constrânsă. Alte molecule modificate, cum ar fi anticorpi specifici unui domeniu, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi cu deleție de domeniu, anticorpi himeri, anticorpi grefați cu CDR, diacorpi, triacorpi, tetrabopi, minicorpi, nanocorpi (de ex. nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți, etc.), imunofarmaceutice modulare mici (SMIP) și domenii variabile IgNAR de rechin, sunt de asemenea cuprinse în expresia "fragment de legare la antigen", așa cum este utilizat aici.

Un fragment de legare la antigen al unui anticorp va cuprinde de obicei cel puțin un domeniu variabil. Domeniul variabil poate fi de orice dimensiune sau compoziție de aminoacizi și va cuprinde în general cel puțin un CDR care este adiacent sau în cadru cu

una sau mai multe secvențe cadru. În fragmentele de legare la antigen având un domeniu V_H asociat cu un domeniu V_L , domeniile V_H și V_L pot fi situate unul față de celălalt în orice aranjament adecvat. De exemplu, regiunea variabilă poate fi dimerică și conține dimeri V_H-V_H , V_H-V_L sau V_L-V_L . Alternativ, fragmentul de legare la antigen al unui anticorp poate conține un domeniu V_H sau V_L monomeric.

În anumite variante de realizare, un fragment de legare la antigen al unui anticorp poate conține cel puțin un domeniu variabil legat covalent la cel puțin un domeniu constant. Configurațiile exemplificative, nelimitative ale domeniilor variabile și constante care pot fi găsite într-un fragment de legare la antigen al unui anticorp din prezenta invenție includ: (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) $V_L-C_H2-C_H3$; și (xiv) V_L-C_L . În orice configurație de domenii variabile și constante, inclusiv oricare dintre exemplele configurațiilor enumerate mai sus, domeniile variabile și constante pot fi fie legate direct între ele, fie pot fi legate printr-o balama sau o regiune de legătură completă sau parțială. O regiune balama poate consta din cel puțin 2 (de exemplu, 5, 10, 15, 20, 40, 60 sau mai mulți) aminoacizi care au ca rezultat o legătură flexibilă sau semiflexibilă între domenii variabile și/sau constante adiacente într-o singură polipeptidă moleculă. Mai mult, un fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții poate cuprinde un homo-dimer sau hetero-dimer (sau alt multimer) al oricăreia dintre configurațiile de domenii variabile și constante enumerate mai sus în asociere necovalentă unul cu celălalt și/ sau cu unul sau mai multe domenii V_H sau V_L monomerice {de exemplu, prin legătură(e) disulfurică}.

Ca și în cazul moleculelor de anticorp complet, fragmentele de legare la antigen pot fi monospecifice sau multispecifice (de exemplu, bispecifice). Un fragment de legare la antigen multispecific al unui anticorp va cuprinde în mod tipic cel puțin două domenii variabile diferite, în care fiecare domeniu variabil este capabil să se lege în mod specific la un antigen separat sau la un epitop diferit de pe același antigen. Orice format de anticorp multispecific, inclusiv formatele de anticorp bispecific exemplificative dezvăluite aici, poate fi adaptat pentru utilizare în contextul unui fragment de legare la antigen al unui anticorp al prezentei invenții utilizând tehnici de rutină disponibile în domeniu.

Regiunea constantă a unui anticorp este importantă în capacitatea unui anticorp de a fixa complementul și de a media citotoxicitatea dependentă de celule. Astfel, izotipul

unui anticorp poate fi selectat pe baza faptului dacă este de dorit ca anticorpul să medieze citotoxicitatea.

Termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă anticorpi având regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane. Anticorpii umani conform invenției pot include totuși resturi de aminoacizi necodificate de secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane (de exemplu, mutații introduse prin mutageneză aleatorie sau specifică locului *in vitro* sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu în CDR și în special CDR3 . Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă anticorpi în care secvențele CDR derivate din linia germinativă a unei alte specii de mamifere, cum ar fi un șoarece, au fost grefate pe secvențe cadru umane.

Termenul "anticorp uman recombinant", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă toți anticorpii umani care sunt preparați, exprimați, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi anticorpii exprimați folosind un vector de expresie recombinant transfectat într-o celulă gazdă (descriș mai jos).), anticorpi izolați dintr-o bibliotecă de anticorpi umani recombinanți, combinatori (descriși mai jos), anticorpi izolați de la un animal (de exemplu, un șoarece) care este transgenic pentru genele imunoglobulinei umane (vezi de exemplu, Taylor și colab. (1992) Nucl. Acizi Res. 20:6287-6295) sau anticorpi preparați, exprimați, creați sau izolați prin orice alte mijloace care implică despicarea secvențelor genei de imunoglobuline umane la alte secvențe ADN. Astfel de anticorpi umani recombinanți au regiuni variabile și constante derivate din secvențele de imunoglobulină germinativă umană. În anumite exemple de realizare, totuși, astfel de anticorpi umani recombinanți sunt supuși mutagenzei *in vitro* (sau, atunci când se utilizează un animal transgenic pentru secvențe Ig umane, mutagenzei somatice *in vivo*) și astfel secvențele de aminoacizi ale regiunilor V_H și V_L ale anticorpilor recombinanți sunt secvențe care, deși derivate din și legate de secvențele V_H și V_L ale liniei germinale umane, pot să nu existe în mod natural în repertoriul liniei germinale de anticorpi umani *in vivo*.

Anticorpii umani pot exista în două forme care sunt asociate cu eterogenitatea balamalei. Într-o formă, o moleculă de imunoglobulină cuprinde o construcție stabilă cu patru lanțuri de aproximativ 150-160 kDa în care dimerii sunt ținuti împreună printr-o legătură disulfurică a lanțului greu intercatenar. Într-o a doua formă, dimerii nu sunt legați prin

legături disulfurice inter-lanț și se formează o moleculă de aproximativ 75-80 kDa compusă dintr-un lanț ușor și greu cuplat covalent (jumătate de anticorp). Aceste forme au fost extrem de greu de separat, chiar și după purificarea prin afinitate.

Frecvența de apariție a celei de-a doua forme în diferite izotipuri IgG intacte se datorează, dar nu se limitează la, diferențelor structurale asociate cu izotipul regiunii balama a anticorpului. O singură substituție de aminoacid în regiunea balama a balamalei IgG4 umană poate reduce semnificativ aspectul celei de-a doua forme (Angal și colab. 1993) Molecular Immunologie 30:105) la niveluri observate în mod tipic utilizând o balama IgG1 umană. Prezenta invenție cuprinde anticorpi având una sau mai multe mutații în balama, regiunea C_H2 sau C_H3 care pot fi de dorit, de exemplu, în producție, pentru a îmbunătăți randamentul formei de anticorpi dorite.

Un "anticorp izolat", așa cum este utilizat aici, înseamnă un anticorp care a fost identificat și separat și/sau recuperat din cel puțin o componentă a mediului său natural. De exemplu, un anticorp care a fost separat sau îndepărtat din cel puțin o componentă a unui organism, sau dintr-un țesut sau celulă în care anticorpul există în mod natural sau este produs în mod natural, este un "anticorp izolat" pentru scopurile prezentei invenții. Un anticorp izolat include, de asemenea, un anticorp in situ într-o celulă recombinată. Anticorpii izolați sunt anticorpi care au fost supuși la cel puțin o etapă de purificare sau izolare. Conform anumitor variante de realizare, un anticorp izolat poate fi în mod substanțial lipsit de alte materiale celulare și/sau substanțe chimice.

Termenul "se leagă în mod specific" sau altele asemenea, înseamnă că un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia formează un complex cu un antigen care este relativ stabil în condiții fiziologice. Metodele pentru determinarea dacă un anticorp se leagă în mod specific la un antigen sunt bine cunoscute în domeniu și includ, de exemplu, dializa la echilibru, rezonanța plasmonului de suprafață și altele asemenea. De exemplu, un anticorp care "se leagă în mod specific" ANGPTL3, așa cum este utilizat în contextul prezentei invenții, include anticorpi care leagă ANGPTL3 sau o porțiune a acestuia cu un KD₀ mai mic de aproximativ 1000 nM, mai puțin de aproximativ 500 nM, mai puțin de aproximativ 300 nM, mai puțin de aproximativ 200 nM, mai puțin de aproximativ 100 nM, mai puțin de aproximativ 90 nM, mai puțin de aproximativ 80 nM, mai puțin de aproximativ 70 nM, mai puțin de aproximativ 60 nM, mai puțin de aproximativ 50 nM, mai puțin de aproximativ 40 nM, mai puțin de aproximativ 30 nM, mai puțin de

aproximativ 20 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 4 nM, mai puțin de aproximativ 3 nM, mai puțin de aproximativ 2 nM, mai puțin de aproximativ 1 nM sau mai puțin de aproximativ 0,5 nM, măsurat într-un test de rezonanță cu plasmoni de suprafață. Un anticorp izolat care leagă în mod specific ANGPTL3 uman, totuși, are reactivitate încrucișată cu alți antigeni, cum ar fi moleculele ANGPTL3 de la alte specii (non-umane).

Anticorpul anti-ANGPTL3 util pentru metodele prezentei invenții pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și/sau deleții în cadrul și/sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor în comparație cu linia germinativă corespunzătoare. Secvențe din care au fost derivați anticorpul. Astfel de mutații pot fi constatate cu ușurință prin compararea secvențelor de aminoacizi dezvăluite aici cu secvențele liniei germinale disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. Prezenta invenție include metode care implică utilizarea de anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen, care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi descrise aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi din unul sau mai multe regiuni cadru și/sau CDR sunt mutați la restul (reziduurile) corespunzătoare ale secvenței de linie germinativă din care a derivat anticorpul, sau la restul (reziduurile) corespunzătoare ale unei alte secvențe de linie germinală umană, sau la o substituție conservativă a aminoacizilor a restului (reziduurilor) de linie germinală (o astfel de modificări de secvență) sunt denumite aici în mod colectiv „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele de regiune variabilă a lanțului greu și ușor descrise aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi și fragmente de legare la antigen care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. În anumite variante de realizare, toate resturile cadru și/sau CDR din domeniile VHand/sau VL sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența germinativă originală din care a fost derivat anticorpul. În alte exemple de realizare, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența originală a liniei germinale, de exemplu, numai resturile mutante găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4, sau numai resturile mutante găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte exemple de realizare, unul sau mai multe dintre resturile cadru și/sau CDR sunt mutate la restul(ele) corespunzător(e) unei secvențe de linie germinală diferită {adică, o secvență de linie germinală care este diferită de secvența

de linie germinală din care a fost anticorpusul. derivate inițial). Mai mult, anticorpii prezentei invenții pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul regiunilor cadru și/sau CDR, de exemplu, în care anumite resturi individuale sunt mutate la restul corespunzător al unei anumite secvențe de linie germinală, în timp ce anumite alte resturi care diferă. din secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe de linie germinală diferită. Odată obținute, anticorpii și fragmentele de legare la antigen care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi testate cu ușurință pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi specificitatea de legare îmbunătățită, afinitatea de legare crescută, proprietățile biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz). fi), imunogenitate redusă etc. Utilizarea anticorpilor și a fragmentelor de legare la antigen obținute în acest mod general este cuprinsă în prezenta invenție.

Prezenta invenție include de asemenea metode care implică utilizarea anticorpilor anti-ANGPTL3 cuprinzând variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, prezenta invenție include utilizarea anticorpilor anti-ANGPTL3 având secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puține, 8 sau mai puține, 6 sau mai puține, 4 sau mai puține, etc. substituții conservatoare de aminoacizi în raport cu oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR descrise aici. Termenul „rezonanță plasmonică de suprafață”, așa cum este utilizat aici, se referă la un fenomen optic care permite analiza interacțiunilor în timp real prin detectarea modificărilor concentrațiilor de proteine într-o matrice a biosenzorului, de exemplu folosind sistemul BIAcore™ (Biacore Life Sciences). divizia GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Termenul " K_D ", așa cum este utilizat aici, este destinat să se refere la constanta de disociere de echilibru a unei interacțiuni particulare anticorpus-antigen.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului în regiunea variabilă a unei molecule de anticorpus cunoscută ca paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, anticorpi diferiți se pot lega la diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Epitopii pot fi fie conformaționali, fie liniari. Un epitop conformațional este produs de aminoacizi juxtapuși spațial din diferite segmente ale lanțului polipeptidic linear. Un epitop liniar este unul produs de resturile de aminoacizi adiacente dintr-un lanț

polipeptidic. În anumite circumstanțe, un epitop poate include fragmente de zaharide, grupări fosforil sau grupări sulfonil de pe antigen.

Conform anumitor variante de realizare, anticorpul anti-ANGPTL3 utilizat în metodele prezentei invenții este un anticorp cu caracteristici de legare dependente de pH. Așa cum este utilizată aici, expresia „legare dependentă de pH” înseamnă că anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia prezintă „legare redusă la ANGPTL3 la pH acid în comparație cu pH neutru” (în scopul prezentei dezvăluiri, ambele expresii pot fi utilizate interschimbabil). De exemplu, anticorpul „cu caracteristici de legare dependente de pH” includ anticorpi și fragmente ale acestora de legare la antigen care leagă ANGPTL3 cu afinitate mai mare la pH neutru decât la pH acid. În anumite exemple de realizare, anticorpul și fragmentele de legare la antigen din prezenta invenție leagă ANGPTL3 cu cel puțin 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, afinitate de 75, 80, 85, 90, 95, 100 sau de mai multe ori mai mare la pH neutru decât la pH acid.

Conform acestui aspect al invenției, anticorpul anti-ANGPTL3 cu caracteristici de legare dependente de pH pot avea una sau mai multe variații de aminoacizi în raport cu anticorpul parental anti-ANGPTL3. De exemplu, un anticorp anti-ANGPTL3 cu caracteristici de legare dependente de pH poate conține una sau mai multe substituții sau inserții de histidină, de exemplu, în una sau mai multe CDR-uri ale unui anticorp parental anti-ANGPTL3. Astfel, în conformitate cu anumite exemple de realizare ale prezentei invenții, sunt furnizate metode care cuprind administrarea unui anticorp anti-ANGPTL3 care cuprinde secvențe de aminoacizi CDR (de exemplu, CDR-uri cu lanț greu și ușor) care sunt identice cu secvențele de aminoacizi CDR ale unui anti- parental. Anticorp ANGPTL3, cu excepția înlocuirii unuia sau mai multor aminoacizi ai unuia sau mai multor CDR-uri ale anticorpului parental cu un rest de histidină. Anticorpul anti-ANGPTL3 cu legare dependentă de pH pot avea, de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau mai multe substituții de histidină, fie într-o singură CDR a unui anticorp parental, fie distribuite în întregime. multiple {de exemplu, 2, 3, 4, 5 sau 6) CDR-uri ale unui anticorp parental anti-ANGPTL3. De exemplu, prezenta invenție include utilizarea anticorpilor anti-ANGPTL3 cu legare dependentă de pH, cuprinzând una sau mai multe substituții de histidină în HCDR1, una sau mai multe substituții de histidină în HCDR2, una sau mai multe substituții de histidină în HCDR3, una sau mai multe substituții de histidină în LCDR1, una sau mai

multe substituții de histidină în LCDR2 și/sau una sau mai multe substituții de histidină în LCDR3, ale unui anticorp parental anti-ANGPTL3.

Așa cum este utilizată aici, expresia "pH acid" înseamnă un pH de 6,0 sau mai mic {de exemplu, mai mic de aproximativ 6,0, mai mic de aproximativ 5,5, mai mic de aproximativ 5,0 etc.}. Expresia „pH acid” include valori ale pH-ului de aproximativ 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, 5,35, 5,2, 5,1, 5,.. 5.05 , 5.0 sau mai puțin. Așa cum este utilizată aici, expresia "pH neutru" înseamnă un pH de aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,4. Expresia „pH neutru” include valori ale pH-ului de aproximativ 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 și 7,4.

Exemple nelimitative de anticorpi anti-ANGPTL3 care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții includ, de exemplu, evinacumab, precum și oricare dintre anticorpilor anti-ANGPTL3 exemplificați, așa cum sunt enunțați în brevetul US nr. 9.018.356 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), a cărui dezvoltare este încorporată prin prezenta prin referință în întregime, sau oricare dintre anticorpilor anti-ANGPTL3 exemplificați, așa cum sunt enunțați în brevetul US nr. 8.742.075 (Lexicon Pharmaceuticals, Inc.), a cărui dezvoltare este încorporată prin prezenta prin referire în întregime.

Prepararea anticorpilor umani

Anticorpilor anti-ANGPTL3 pot fi fabricați conform oricărei metode de producere/izolare a anticorpilor cunoscute în domeniu. De exemplu, anticorpilor pot fi obținuți prin tehnologii de hibridom, prin prezentare pe fagi, prin prezentare cu drojdie etc. Anticorpilor pentru utilizare în metodele prezentei invenții pot fi, de exemplu, anticorpi himeric, anticorpi umanizați sau anticorpi complet umani.

Metodele pentru generarea de anticorpi umani la șoarecii transgenici sunt cunoscute în domeniu. Orice astfel de metode cunoscute pot fi utilizate pentru a produce anticorpi umani care leagă în mod specific ANGPTL3.

De exemplu, utilizând tehnologia VELOCIMMUNE™ (vezi, de exemplu, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals) sau orice altă metodă cunoscută pentru generarea de anticorpi monoclonali, anticorpilor himeric de mare afinitate la ANGPTL3 sunt inițial izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Tehnologia VELOCIMMUNE® implică generarea unui șoarece transgenic având un genom care cuprinde regiuni variabile ale lanțului greu și ușor uman legate operațional de loci de

regiune constantă de șoarece endogene, astfel încât șoarecele produce un anticorp care cuprinde o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece ca răspuns la antigenic stimulare. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale anticorpului este izolat și legat operațional la ADN-ul care codifică regiunile constante ale lanțului greu și ușor uman. ADN-ul este apoi exprimat într-o celulă capabilă să exprime anticorpul complet uman.

În general, un șoarece VELOCIMMUNE® este provocat cu antigenul de interes și celulele limfatice (cum ar fi celulele B) sunt recuperate de la șoarecii care exprimă anticorpi. Celulele limfatice pot fi fuzionate cu o linie celulară de mielom pentru a prepara linii celulare de hibridom nemuritoare, iar astfel de linii celulare de hibridom sunt selectate și selectate pentru a identifica liniile celulare de hibridom care produc anticorpi specifici antigenului de interes. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțului greu și lanțului ușor poate fi izolat și legat de regiuni constante izotipice dorite ale lanțului greu și lanțului ușor. O astfel de proteină anticorp poate fi produsă într-o celulă, cum ar fi o celulă CHO. Alternativ, ADN-ul care codifică anticorpii himeric specifici antigenului sau domeniile variabile ale lanțurilor ușor și grele pot fi izolate direct din antigenul-specific limfocitelor. Inițial, anticorpii himeric de mare afinitate sunt izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii sunt caracterizați și selectați pentru caracteristicile dorite, incluzând afinitatea, selectivitatea, epitopul etc., utilizând proceduri standard cunoscute specialiștilor în domeniu. Regiunile constante de șoarece sunt înlocuite cu o regiune constantă umană dorită pentru a genera anticorpul complet uman conform invenției, de exemplu IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificat. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate mare și specificitate țintă rezidă în regiunea variabilă. În general, anticorpii care pot fi utilizați în metodele prezentei invenții posedă afinități mari, așa cum s-a descris mai sus, atunci când sunt măsurați prin legarea la antigen fie imobilizat pe fază solidă, fie în fază soluție. Regiunile constante de șoarece sunt înlocuite cu regiuni constante umane dorite pentru a genera anticorpii complet umani conform invenției. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate mare și specificitate țintă rezidă în regiunea variabilă.

În prezenta invenție, anticorpus anti-ANGPTL3 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia cuprinde regiuni care determină complementaritatea lanțului greu și ușor (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3) cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, 8 și 9.

În anumite exemple de realizare ale prezentei invenții, anticorpus anti-ANGPTL3, sau fragmentul acestuia de legare la antigen, care poate fi utilizat în metodele care cuprind un HCVR având secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:2 și un LCVR având secvența de aminoacizi a SEQ ID NO:3.

Compoziții farmaceutice și metode de administrare

Prezenta invenție include metode care cuprind administrarea unui inhibitor ANGPTL3 la un pacient, în care inhibitorul ANGPTL3 este conținut într-o compoziție farmaceutică. Compozițiile farmaceutice ale invenției sunt formulate cu purtători adecvați, excipienți și alți agenți care asigură transferul, livrarea, toleranța adecvate și altele asemenea. O multitudine de formulări adecvate pot fi găsite în formularul cunoscut de toți chimiștii farmaceutici: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Aceste formulări includ, de exemplu, pulberi, paste, unguente, jeleuri, ceară, uleiuri, lipide, vezicule care conțin lipide (cationice sau anionice) (cum ar fi LIPOFECTIN™), conjugați ADN, paste de absorbție anhidre, ulei în apă și emulsii apă - în ulei, emulsii carbowax (polietilen glicoli de diferite greutatea moleculare), geluri semisolidе și amestecuri semisolidе care conțin carbowax. Vezi, de asemenea, Powell et al. "Compendiu de excipienți pentru formulări parenterale" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Sunt cunoscute diferite sisteme de livrare și pot fi utilizate pentru a administra compoziția farmaceutică a invenției, de exemplu, încapsularea în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime virusurile mutante, endocitoza mediată de receptor (vezi, de exemplu, Wu și colab., 1987, J. Biol. Chim. 262:4429-4432). Metodele de administrare includ, dar nu se limitează la, căile intradermice, intramusculare, intraperitoneale, intravenoase, subcutanate, intranazale, epidurale și orale. Compoziția poate fi administrată pe orice cale convenabilă, de exemplu prin perfuzie sau injectare în bolus, prin absorbție prin epiteliu sau mucoasa mucocutanată (de exemplu, mucoasa bucală, mucoasa rectală și intestinală etc.) și poate fi administrată împreună cu alți agenți biologic activi.

O compoziție farmaceutică a prezentei invenții poate fi furnizată subcutanat sau intravenos cu un ac standard și o seringă. În plus, în ceea ce privește administrarea subcutanată, un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) are aplicații în eliberarea unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Un astfel de dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) poate fi reutilizabil sau de unică folosință. Un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) reutilizabil utilizează în general un cartuș înlocuibil care conține o compoziție farmaceutică. Odată ce toată compoziția farmaceutică din cartuș a fost administrată și cartușul este gol, cartușul gol poate fi aruncat cu ușurință și înlocuit cu un cartuș nou care conține compoziția farmaceutică. Dispozitivul de livrare a pixului poate fi apoi reutilizat. Într-un dispozitiv de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință, nu există un cartuș înlocuibil. Mai degrabă, dispozitivul de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință vine pre-umplut cu compoziția farmaceutică menținută într-un rezervor în interiorul dispozitivului. Odată ce rezervorul este golit de compoziția farmaceutică, întregul dispozitiv este aruncat.

Numeroase dispozitive de eliberare a stiloului injector (pen) și autoinjector reutilizabile au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Exemplele includ, dar nu se limitează la, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Marea Britanie), Pix DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Elveția), stilou injector HUMALOG MIX 75/25™, stilou injector HUMALOG™, stilou stilou HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II și III (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), stilou BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ și OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germania), pentru a numi doar câteva. Exemple de dispozitive de livrare a stiloului injector (pen) de unică folosință care au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice a prezentei invenții includ, dar nu se limitează la, stilou injector (SOLOSTAR™) (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) și KWIKPEN™ (Eli Lilly), autoinjectorul SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germania), EPIPEN (Dey, L.P.) și tneHUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park IL), pentru a numi doar câteva.

În anumite situații, compoziția farmaceutică poate fi eliberată într-un sistem de eliberare controlată. Într-o variantă de realizare, poate fi utilizată o pompă (vezi Langer, supra;

Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. ing. 14:201). Într-un alt exemplu de realizare, pot fi utilizate materiale polimerice; vezi, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Într-un alt exemplu de realizare, un sistem cu eliberare controlată poate fi plasat în apropierea țintei compoziției, necesitând astfel doar o fracțiune din doza sistemică (vezi, de exemplu, Goodson, 1984, în Medical Applications of Controlled Release, supra, voi. 2, pp. 115-138). Alte sisteme de eliberare controlată sunt discutate în recenzia lui Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Preparatele injectabile pot include forme de dozare pentru injecții intravenoase, subcutanate, intracutanate și intramusculare, perfuzii prin picurare etc. Aceste preparate injectabile pot fi preparate prin metode cunoscute. De exemplu, preparatele injectabile pot fi preparate, de exemplu, prin dizolvarea, suspendarea sau emulsionarea anticorpului sau a sării sale descrise mai sus într-un mediu apos steril sau într-un mediu uleios utilizat în mod convențional pentru injecții. Ca mediu apos pentru injecții, există, de exemplu, soluție salină fiziologică, o soluție izotonă care conține glucoză și alți agenți auxiliari, etc., care pot fi utilizate în combinație cu un agent de solubilizare adecvat, cum ar fi un alcool (de exemplu, etanol), un polialcool (de exemplu, propilen glicol, polietilen glicol), un agent activ de suprafață neionic [de exemplu, polisorbitat 80, HCO-50 (aduct polioxietilen (50 mol) de ulei de ricin hidrogenat)], etc. Ca mediu uleios, se folosesc, de exemplu, ulei de susan, ulei de soia, etc., care pot fi utilizate în combinație cu un agent de solubilizare cum ar fi benzoat de benzii, alcool benzilic etc. Injecția astfel preparată este de preferință umplută într-o fiolă adecvată.

În mod avantajos, compozițiile farmaceutice pentru utilizare orală sau parenterală descrise mai sus sunt preparate în forme de dozare într-o doză unitară potrivită pentru a se potrivi unei doze de ingrediente active. Astfel de forme de dozare într-o doză unitară includ, de exemplu, tablete, pastile, capsule, injecții (fiole), supozitoare etc.

Dozare

Cantitatea de inhibitor ANGPTL3 (de exemplu, anticorp anti-ANGPTL3) administrată unui subiect conform metodelor prezentei invenții este, în general, o cantitate eficientă terapeutic. Așa cum este utilizată aici, expresia „cantitate eficientă terapeutic” înseamnă o doză de inhibitor ANGPTL3 care are ca rezultat o reducere detectabilă (cel puțin

aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% , 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau mai mulți față de valoarea inițială) în unul sau mai mulți parametri selectați din grupul constând din LDL-C, ApoB100, non-HDL-C, colesterol total, VLDL-C, trigliceride, Lp(a) și colesterol rămas, sau o cantitate care previne sau atenuează ateroscleroza la un subiect (așa cum este descris în altă parte aici).

În cazul unui anticorp anti-ANGPTL3, o cantitate eficientă terapeutic poate fi de la aproximativ 0,05 mg până la aproximativ 600 mg, de exemplu, aproximativ 0,05 mg, aproximativ 0,1 mg, aproximativ 1,0 mg, aproximativ 1,5 mg, aproximativ 2,0 mg , aproximativ 10 mg, aproximativ 20 mg, aproximativ 30 mg, aproximativ 40 mg, aproximativ 50 mg, aproximativ 60 mg, aproximativ 70 mg, aproximativ 80 mg, aproximativ 90 mg, aproximativ 100 mg, aproximativ 110 mg, aproximativ 120 mg, aproximativ 130 mg, aproximativ 140 mg, aproximativ 160 mg, aproximativ 170 mg, aproximativ 180 mg, aproximativ 190 mg, aproximativ 200 mg, aproximativ 210 mg, aproximativ 220 mg, aproximativ 230 mg, aproximativ 240 mg, aproximativ 250 mg, aproximativ 260 mg, aproximativ 270 mg, aproximativ 280 mg, aproximativ 290 mg, aproximativ 300 mg, aproximativ 310 mg, aproximativ 320 mg, aproximativ 330 mg, aproximativ 340 mg, aproximativ 350 mg, aproximativ 360 mg, aproximativ 370 mg, aproximativ 380 mg, aproximativ 390 mg, aproximativ 400 mg, aproximativ 410 mg, aproximativ 420 mg, aproximativ 430 mg, aproximativ 440 mg, aproximativ 450 mg, aproximativ 460 mg, aproximativ 470 mg, aproximativ 480 mg, aproximativ 490 mg, aproximativ 500 mg, aproximativ 510 mg, aproximativ 520 mg, aproximativ 530 mg, aproximativ 540 mg, aproximativ 550 mg, aproximativ 560 mg, aproximativ 570 mg, aproximativ 580 mg, aproximativ 590 mg sau aproximativ 600 mg de anticorp anti-ANGPTL3. Alte cantități de dozare de inhibitori ANGPTL3 vor fi evidente pentru persoanele cu calificare obișnuită în domeniu și sunt avute în vedere în scopul prezentei invenții.

Cantitatea de anticorp anti-ANGPTL3 conținută în dozele individuale poate fi exprimată în miligrame de anticorp per kilogram de greutate corporală a pacientului {adică, mg/kg). De exemplu, anticorpul anti-ANGPTL3 poate fi administrat unui pacient la o doză de aproximativ 0,0001 până la aproximativ 10 mg/kg greutate corporală a pacientului.

Terapii combinate

Așa cum este descris în altă parte aici, metodele prezentei invenții pot cuprinde administrarea unui inhibitor ANGPTL3 la un pacient în combinație cu („pe deasupra”) terapia de scădere a lipidelor prescrisă anterior pacientului. De exemplu, în contextul prevenirii sau atenuării aterosclerozei, un inhibitor ANGPTL3 poate fi administrat unui pacient în combinație cu un regim terapeutic zilnic stabil de statine. Exemple de regimuri terapeutice zilnice cu statine cu care un inhibitor ANGPTL3 poate fi administrat în combinație în contextul prezentei invenții includ, de exemplu, atorvastatina (10, 20, 40 sau 80 mg pe zi), (atorvastatină/ezetimib 10/10 sau 40/10 mg pe zi), rosuvastatină (5, 10 sau 20 mg pe zi), cerivastatin (0,4 sau 0,8 mg pe zi), pitavastatină (1, 2 sau 4 mg pe zi), fluvastatina (20, 40 sau 80 mg pe zi), simvastatină (5, 10, 20, 40 sau 80 mg pe zi), simvastatină/ezetimib (10/10, 20/10, 40/10 sau 80/10 mg pe zi), lovastatin (10, 20 , 40 sau 80 mg pe zi), pravastatina (10, 20, 40 sau 80 mg pe zi) și combinații ale acestora. Alte terapii de scădere a lipidelor cu care poate fi administrat un inhibitor ANGPTL3 în combinație în contextul prezentei invenții includ, de exemplu, (1) un agent care inhibă absorbția colesterolului și sau reabsorbția acidului biliar (de exemplu, ezetimib); (2) un agent care crește catabolismul lipoproteinelor (cum ar fi niacina); și/sau (3) activatori ai factorului de transcripție LXR care joacă un rol în eliminarea colesterolului, cum ar fi 22-hidroxicolesterolul.

Conform anumitor exemple de realizare, prezenta invenție cuprinde metode pentru prevenirea sau atenuarea aterosclerozei la un subiect prin administrarea unui inhibitor ANGPTL3 unui subiect în combinație cu un inhibitor al ANGPTL4 (de exemplu, un anticorp anti-ANGPTL4 sau un fragment al acestuia de legare la antigen), un inhibitor al ANGPTL8 {de exemplu, un anticorp anti-ANGPTL8 sau un fragment al acestuia de legare la antigen) și/sau un inhibitor al PCSK9 {de exemplu, un anticorp anti-PCSK9 sau un fragment al acestuia de legare la antigen). Exemple nelimitative de anticorpi anti-PCSK9 care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții includ, de exemplu, alirocumab, evolocumab, bococizumab, lodelcizumab, ralpancizumab sau porțiuni de legare la antigen ale oricăruia dintre anticorpii de mai sus.

Regimuri de administrare

În conformitate cu anumite exemple de realizare ale prezentei invenții, doze multiple de inhibitor ANGPTL3 {adică o compoziție farmaceutică care cuprinde un inhibitor ANGPTL3} pot fi administrate unui subiect pe o perioadă de timp definită (de exemplu, pe lângă un regim terapeutic zilnic cu statine sau altă terapie de fond hipolipemiant). Metodele conform acestui aspect al invenției cuprind administrarea secvențială la un subiect de doze multiple de inhibitor ANGPTL3. Așa cum este utilizat aici, "administrarea secvențială" înseamnă că fiecare doză de inhibitor ANGPTL3 este administrată subiectului la un moment diferit de timp, de exemplu, în zile diferite separate printr-un interval predeterminat {de exemplu, ore, zile, săptămâni sau luni}. Prezenta invenție include metode care cuprind administrarea secvențială la pacient a unei singure doze inițiale de inhibitor ANGPTL3, urmată de una sau mai multe doze secundare de inhibitor ANGPTL3 și, opțional, urmat de una sau mai multe doze terțiare de inhibitor ANGPTL3. Termenii "doză inițială", "doze secundare" și "doze terțiare" se referă la secvența temporală de administrare a dozelor individuale dintr-o compoziție farmaceutică care cuprinde un inhibitor ANGPTL3. Astfel, "doza inițială" este doza care este administrată la începutul regimului de tratament (denumită și "doză de bază"); "dozele secundare" sunt dozele care sunt administrate după doza inițială; iar "dozele terțiare" sunt dozele care sunt administrate după dozele secundare. Dozele inițiale, secundare și terțiare pot conține toate aceeași cantitate de inhibitor ANGPTL3, dar în general pot diferi unele de altele în ceea ce privește frecvența administrării. În anumite exemple de realizare, totuși, cantitatea de inhibitor ANGPTL3 conținută în dozele inițiale, secundare și/sau terțiare variază una de la alta (de exemplu, ajustată în sus sau în jos după caz) în timpul tratamentului. În anumite exemple de realizare, două sau mai multe {de exemplu, 2, 3, 4 sau 5} doze sunt administrate la începutul regimului de tratament ca „doze de încărcare” urmate de doze ulterioare care sunt administrate pe o bază mai puțin frecventă {de exemplu, „doze de întreținere”}.

Conform exemplurilor de realizare ale prezentei invenții, fiecare doză secundară și/sau terțiară este administrată de la 1 la 26 {de exemplu, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ sau mai mult} săptămâni după doza imediat anterioară. Expresia "doza imediat anterioară", așa cum este utilizată aici, înseamnă, într-o secvență de administrări

multiple, doza de moleculă de legare a antigenului care este administrată unui pacient înainte de administrarea dozei următoare în secvența fără doze de intervenție.

Metodele conform acestui aspect al invenției pot cuprinde administrarea unui pacient a oricărui număr de doze secundare și/sau terțiare de inhibitor ANGPTL3. De exemplu, în anumite variante de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză secundară. În alte variante de realizare, pacientului i se administrează două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze secundare. De asemenea, în anumite exemple de realizare, pacientului i se administrează doar o singură doză terțiară. În alte exemple de realizare, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze terțiare sunt administrate pacientului.

În exemplele de realizare care implică doze secundare multiple, fiecare doză secundară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze secundare. De exemplu, fiecare doză secundară poate fi administrată pacientului la 1 până la 2, 4, 6, 8 sau mai multe săptămâni după doza imediat anterioară. În mod similar, în exemplele de realizare care implică mai multe doze terțiare, fiecare doză terțiară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze terțiare. De exemplu, fiecare doză terțiară poate fi administrată pacientului la 1 până la 2, 4, 6, 8 sau mai multe săptămâni după doza imediat anterioară. Alternativ, frecvența la care dozele secundare și/sau terțiare sunt administrate unui pacient poate varia pe parcursul regimului de tratament. Frecvența de administrare poate fi, de asemenea, ajustată în timpul tratamentului de către un medic, în funcție de nevoile pacientului în parte după examenul clinic.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt prezentate astfel încât să ofere celor cu calificare obișnuită în domeniu o dezvăluire și o descriere completă a modului de realizare și utilizare a metodelor și compozițiilor invenției și nu au scopul de a limita domeniul de aplicare a ceea ce consideră inventatorii. ca invenția lor. S-au făcut eforturi pentru a asigura acuratețea cu privire la numerele utilizate (de exemplu, cantități, temperatură etc.), dar ar trebui luate în considerare unele erori și abateri experimentale. Dacă nu se indică altfel, părțile sunt părți în greutate, greutatea moleculară este greutatea moleculară medie, temperatura este în grade Centigrade și presiunea este la sau aproape de atmosferă.

Exemplul 1. Generarea de anticorpi umani la ANGPTL3 uman

Anticorpul uman anti-ANGPTL3 a fost generat așa cum este descris în brevetul US nr. 9.018.356. Exemplul de inhibitor ANGPTL3 utilizat în exemplul următor este anticorpul uman anti-ANGPTL3 denumit „H4H1276S”, cunoscut și ca „evinacumab”. „Evinacumab” are următoarele caracteristici de secvență de aminoacizi: un lanț greu cuprinzând SEQ ID NO:10 și un lanț ușor cuprinzând SEQ ID NO:11; o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) care cuprinde SEQ ID NO:2 și o catenă variabilă ușor domeniu (LCVR) cuprinzând SEQ ID NO:3; o regiune care determină complementaritatea lanțului greu 1 (HCDR1) cuprinzând SEQ ID NO:4, un HCDR2 cuprinzând SEQ ID NO:5, un HCDR3 cuprinzând SEQ ID NO:6, o complementaritate a lanțului ușor regiunea de determinare 1 (LCDR1) cuprinzând SEQ ID NO:7, un LCDR2 cuprinzând SEQ ID NO:8 și un LCDR3 cuprinzând SEQ ID NO:9.

Exemplul 2. Un anticorp anti-ANGPTL3 previne dezvoltarea aterosclerozei la un model de șoarece

INTRODUCERE

Obiectivul acestui studiu a fost de a evalua efectul inhibării ANGPTL3 asupra dezvoltării aterosclerozei în APOE*3 Leiden.Șoarecii CETP, un model bine stabilit pentru hiperlipidemie cu toate caracteristicile disbetalipoproteinemiei mixte sau familiale și ateroscleroza. (A se vedea, de exemplu, Kuhnast et al., 2014, J Lipid Res 55: 2103-2112, pentru o descriere generală a APOE*3Leiden. Modelul de șoarece CETP (denumit în mod alternativ aici „șoareci E3L.CETP”) și utilizarea acestuia în evaluarea efectelor unui agent farmacologic asupra dezvoltării aterosclerozei).

Inhibarea ANGPTL3 a fost realizată utilizând un anticorp anti-ANGPTL3. Anticorpul special anti-ANGPTL3 utilizat în aceste studii a fost anticorpul denumit evinacumab, așa cum este descris mai sus. Anticorpul de control utilizat în aceste studii este un anticorp potrivit cu izotip la o țintă irelevantă.

PROIECTARE STUDIU

O ilustrare a designului studiului este prezentată în Figura 1. Evinacumab este un anticorp IgG4 complet uman. Astfel, atunci când sunt evaluați în diferite tulpini de șoarece, unii șoareci dezvoltă anticorpi anti-medicament care elimină eficacitatea medicamentului. Procentul de șoareci care dezvoltă acest răspuns anti-drog poate fi diferit pentru fiecare model de șoarece/fond genetic. Din acest motiv, mai mulți șoareci per grup au fost incluși în acest prim studiu în APOE*3Leiden. Șoarecii CETP pentru a determina câți șoareci dezvoltă un răspuns imun anti-uman în acest model special. După excluderea șoarecilor care dezvoltă un răspuns imun anti-uman, șoarecii rămași ar putea fi utilizați pentru evaluarea efectului evinacumabului asupra aterosclerozei.

Șaizeci și trei de femei APOE*3Leiden. Șoarecii CETP au fost puși pe dieta T (o dietă modificată semi-sintetică așa cum este descrisă de Nishina și colab. 1990, J Lipid Res 31:859, cu 0,15% colesterol adăugat și 15% unt de cacao. După o perioadă de prelevare de 4 săptămâni, 13 șoareci cu răspuns scăzut au fost eliminați din studiu, iar restul de 50 de șoareci au fost sub-împărțiți într-un grup de control de douăzeci de șoareci și un grup de tratament cu evinacumab de treizeci de șoareci, potrivite pentru greutatea corporală, colesterolul plasmatic și trigliceride după 4h de post (t=0).

Tratamentul cu evinacumab sau anticorp de control a fost administrat săptămânal prin injecții subcutanate la o doză de 25 mg/kg/săptămână. Volumul de injectare în timpul perioadei de tratament a fost de 10 ml/kg utilizând 0,9% NaCl ca vehicul și a fost ajustat la ultima valoare măsurată a greutății corporale. Greutatea corporală și aportul de alimente (per cușcă) au fost măsurate în săptămâna 0, 3, 6, 8, 11 și 13.

După 0, 2, 4, 6, 8, 11 și 13 săptămâni de tratament au fost recoltate probe de sânge după patru ore de post. Colesterolul plasmatic și trigliceridele au fost măsurate individual și s-a colectat plasmă EDTA suplimentară pentru evaluarea hFc și a anticorpilor anti-umani de șoarece. După 6 săptămâni de tratament a fost evaluat primul răspuns anti-medicament și 3 șoareci din grupul de control și 5 șoareci din grupul de tratament cu niveluri ridicate de anticorpi anti-medicament au fost îndepărtați din studiu.

Profilurile de lipoproteine au fost măsurate în săptămâna 0, 6 și 13 în probe de plasmă, reunite pe grup. Fecalele au fost colectate per cușcă în timpul săptămânii 12 (de două ori timp de 48 de ore). La t=13 șoarecii au fost sacrificați fără post. Plasma EDTA a fost obținută prin puncție cardiacă și au fost colectate mai multe țesuturi. Dezvoltarea aterosclerozei în rădăcina aortică a fost măsurată la 15 șoareci per grup (după excluderea

șoarecilor care au dezvoltat un răspuns anti-medicament) prin măsurarea numărului de leziuni, a zonei leziunii și a severității leziunii. În plus, a fost determinată compoziția leziunii.

(1) Programul de măsurare a parametrilor este următorul:

(2) Greutatea corporală (săptămâna 0, 3, 6, 8, 11 și 13);

(3) Aportul alimentar (pe cușcă, săptămâna 0, 3, 6, 8, 11 și 13);

(4) Colesterol total plasmatic și trigliceride (după 4 ore de post în săptămâna 0, 2, 4, 6, 8, 11 și 13);

(5) Colectarea de 20 μ l plasmă EDTA pentru evaluarea hFc și a anticorpilor anti-umani de șoarece (după 4 ore de post în săptămâna 0, 2, 4, 6, 8, 11 și 13);

(6) Profiluri lipoproteice (colesterol și trigliceride, reunite pe grup; în săptămâna 0, 6 și 13);

(7) Dezvoltarea aterosclerozei la rădăcina aortică (15 șoareci per grup): (a) Numărul leziunii, (b) Suprafața totală a leziunii, (c) Severitatea leziunii, (d) Compoziția leziunii (de exemplu, macrofage, celule musculare netede în capac, necroză și conținutul de colagen) și (e) aderența monocitelor. (La sacrificiu [săptămâna 13], aortele au fost colectate de la toți șoarecii, totuși analiza aterosclerozei a fost efectuată cu 15 șoareci per grup; șoarecii care nu au dezvoltat anticorpi anti-medicament au fost selectați).

METODE

Măsurătorile greutății corporale și ale consumului de alimente au fost efectuate conform procedurilor standard.

Probele de sânge din plasmă au fost obținute conform procedurilor standard. Colesterolul plasmatic total și trigliceridele au fost determinate folosind truse disponibile comercial.

Măsurarea profilurilor de lipoproteine prin analiza FPLC utilizând un aparat AKTA de la Amersham Biosciences. Analizele au fost efectuate în probe reunite pe grup. Colesterolul și trigliceridele au fost măsurate în fracții folosind truse disponibile comercial.

Zona și severitatea leziunii aterosclerotice au fost evaluate în zona rădăcinii aortice așa cum a fost raportat anterior (vezi, de exemplu, Kuhnast și colab., 2012, J Hypertens 30:107-116). Rădăcina aortică a fost identificată prin apariția foițelor valvei aortice și secțiuni transversale în serie ale întregii zone a rădăcinii aortice (5 μ m grosime cu

intervale de 50 μm) au fost montate pe lame acoperite cu 3-aminopropil trietoxisilan și colorate cu hematoxin-floxină- șofran (HPS). Pentru fiecare șoarece, aria leziunii a fost măsurată în 4 secțiuni ulterioare. Fiecare secțiune este formată din 3 segmente (separate de supape). Pentru determinarea mărimii și severității leziunii aterosclerotice, leziunile au fost clasificate în cinci categorii conform Asociației Americane de Inimă (AHA) (vezi Stary și colab., 1995, *Arterioscler Thromb Vase Biol* 15:1512-1531): Tipul 1: Gras timpuriu dungi (până la 10 celule de spumă în intima fără alte modificări); Tipul 2: dungi grase obișnuite (zece sau mai multe celule de spumă în intima fără alte modificări); Tipul 3: Placă ușoară (celule de spumă cu capac fibrotic); Tipul 4: Placă moderată (leziuni mai avansate cu un mediu afectat, dar fără pierderea arhitecturii mediilor); Tipul 5: Placă severă (media este grav afectată; se observă frecvent fibre elastice rupte, despicături de colesterol, calcifiere și necroză).

Imaginile au fost realizate cu un microscop Olympus BX51 și zonele au fost măsurate cu software-ul de procesare a imaginilor. Aria totală a leziunii și numărul de leziuni au fost calculate pe secțiune transversală. Segmentele neboli au fost calculate ca procent din segmentele totale. Severitatea leziunii ca procent din totalul leziunilor a fost de asemenea determinată. Leziunile de tip I-III au fost clasificate ca leziuni ușoare, iar leziunile de tip IV-V au fost clasificate ca leziuni severe.

Numărul de monocite care aderă la endoteliul activat a fost numărat în fiecare segment utilizat pentru cuantificarea leziunilor, după imunocolorare cu antiser AIA 31240 (1:1000; Accurate Chemical and Scientific, New York, New York, SUA) și calculat pe secțiune transversală.

Aria macrofagului a leziunilor a fost măsurată după imunocolorare cu Mac-3 anti-șoarece (1:50; BD Pharmingen, Țările de Jos). Colorația cu roșu Sirius a fost efectuată pentru a colora colagenul. Suprafața celulelor musculare netede a capacului fibrotic a fost măsurată după imunocolorare cu actină anti-alfa mușchiului neted (1:400; PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germania) care reacționează încrucișat cu alfa actină de șoarece. Fotografiile/Imaginile leziunilor au fost realizate cu microscopul Olympus BX51. Macrofagele, colagenul, miezul necrotic și zona celulelor musculare netede a leziunilor au fost cuantificate folosind software-ul de imagistică. Macrofagele, celulele musculare netede (SMC), miezul necrotic și conținutul de colagen al leziunilor au fost calculate ca procent din zona leziunii. Indicele de vulnerabilitate/stabilitate a plăcii a fost calculat

împărțind suma factorilor stabilizatori SMC și collagen la suma factorilor de destabilizare, macrofage și miez necrotic.

În săptămâna 13, șoarecii au fost sacrificați fără repaus prin CO₂. Nu a fost administrată ultima injecție de anticorpi în săptămâna 13 înainte de sacrificiu. După sacrificiu, s-a colectat cât mai mult EDTA-plasmă (prin puncție cardiacă) și s-a păstrat la -70°C până la utilizare ulterioară. Inimile, inclusiv rădăcina aortică, au fost fixate în formol 10%. Aorta toracică a fost colectată și fixată în formol 10%.

STATISTICI

În funcție de normalitate, semnificația diferențelor dintre grupuri a fost calculată neparametric, utilizând programul de calculator SPSS și un test U Mann-Whitney pentru probe independente. O valoare $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă statistic. Diferențele statistice ale grupului de tratament în comparație cu grupul de control sunt indicate cu un asterisc la punctele de măsură din figuri

REZULTATE

GREUTATE CORPORALĂ

Rezultatele greutății corporale sunt rezumate în Tabelul 1. Valorile sunt valori absolute (grame) și sunt medii $\pm$ S.D. de la 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 1

Greutate corporală (g)							
Timp (săptămâni)		t=0	t=3	t=6	t=8	t=11	t=13
Control anticorp (AB)	AVG	21.8	21.6	22.1	22.7	23.6	23.4
	SD	1.4	1.2	1.3	1.4	1.7	2.0
Evinacumab	AVG	21.3	21.6	21.8	22.2	23.1	23.0
	SD	1.4	1.5	1.4	1.3	1.5	1.7
Greutate corporală: Valoare -P		t=0	t=3	t=6	t=8	t=11	t=13
Control vs. evinacumab		0.400	0.747	0.425	0.477	0.715	0.847
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney							

Nu au existat diferențe în greutatea corporală între grupul tratat cu evinacumab în comparație cu grupul de control.

INGESTIUL ALIMENTAR

Rezultatele consumului de alimente sunt rezumate în tabelul 2. Valorile sunt valori absolute (gram/șoarece/zi) și sunt mijloace $\pm$ S.D. din 17 cuști (toți șoarecii; înainte de potrivire) sau 4-6 cuști (după potrivire și începerea tratamentului).

TABEL 2

Ingestiul alimentar (g/m/d)							
Timp (săptămâni)		t=0	t=3	t=6	t=8	t=11	t=13
Control AB	AVG	2.9	2.6	2.4	2.3	2.6	2.5
	SD	0.2	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4
Evinacumab	AVG	2.9	2.7	2.4	2.3	2.5	2.5
	SD	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4
Ingestiul alimentar: Valoare-P		t=0	t=3	t=6	t=8	t=11	t=13
Control vs. evinacumab		n/a	0.476	0.914	0.914	0.914	1.000
Analiză neparametrică: Testu U Mann Whitney							

Nu au existat diferențe în ceea ce privește aportul de alimente pentru grupul tratat cu evinacumab în comparație cu grupul de control.

COLESTEROL PLASMATIC

Rezultatele colesterolului plasmatic sunt rezumate în tabelele 3 și 4 și în figurile 2A și 2B. Valorile sunt valori absolute (mM) și sunt medii $\pm$ S.D. de la 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 3

Colesterol (mM)								
Timp (săptămâni)		t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Control AB	AVG	24.1	29.9	28.0	26.7	27.6	22.1	20.9
	SD	3.1	5.0	4.5	3.3	4.5	5.4	4.6
Evinacumab	AVG	23.7	12.6	14.0	14.1	13.6	10.8	9.6
	SD	2.4	2.4	1.9	2.2	2.5	1.7	2.1
Colesterol: Valoare-P		t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Control vs. evinacumab		0.9.14	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney								

TABELUL 4

Colesterol (mM)		Expunere Colesterol total (nM*săpt)
Timp (săptămâni)		t=13
Control AB	AVG	393.5
	SD	49.7
Evinacumab	AVG	230.2
	SD	23.8
Expunere colesterol: Valoare-P		t=13
Control vs. evinacumab		<0.001
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney		

Tratamentul cu evinacumab a condus la o scădere semnificativă a colesterolului plasmatic în comparație cu grupul de control la toate momentele de timp (scădere medie de 52%). La sfârșitul experimentului, expunerea la colesterol în timpul experimentului (0-13 săptămâni + perioada de prelungire) a fost semnificativ scăzută la tratamentul cu evinacumab (cu 41 %, $p<0,001$) în comparație cu grupul de control.

TRGLICERIDE PLASMATICE

Rezultatele trigliceridelor plasmatice sunt rezumate în Tabelul 5 și Figura 3. Valorile sunt valori absolute (mM) și sunt medii $\pm$ S.D. de la 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 5

Trigliceride (mM)								
Timp (săptămâni)		t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Control AB	AVG	7.5	5.5	4.9	4.8	3.6	4.0	3.4
	SD	2.6	1.3	1.6	1.5	1.3	1.0	1.2
Evinacumab	AVG	7.4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6
	SD	2.0	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2
Trigliceride: Valoare-P		t=0	t=2	t=4	t=6	t=8	t=11	t=13
Control vs. evinacumab		0.747	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Analiză neparametrică; Tes U Mann Whitney								

Tratamentul cu evinacumab a condus la o scădere semnificativă a trigliceridelor plasmatice în comparație cu grupul de control la toate momentele de timp (scădere medie de 84%).

PROFILURI DE LIPOPROTEINE

Lipoproteinele au fost separate pe o coloană Superose. Frațiile de colesterol și trigliceride la t=0, t=6 săptămâni și t=13 săptămâni sunt prezentate în figurile 4A, 4B și 4C [colesterol] și 5A, 5B și 5C [trigliceride]. Valorile sunt valori absolute din măsurătorile de colesterol și trigliceride în plasmă combinată per grup la t=0, 6 și 13 săptămâni. În scopul acestei analize, fracțiile 3-7 au fost considerate VLDL; 8-16 ca IDL/LDL și 17-24 ca HDL.

La t=0, înainte de începerea tratamentelor, nu s-au observat diferențe în profilurile lipoproteice, în timp ce după 6 și 13 săptămâni de tratament cu evinacumab nivelurile de colesterol plasmatic, măsurate în probele reunite pe grup, au fost scăzute în vârful VLDL-LDL, deoarece comparativ cu grupul de control și a părut a fi crescut în vârful HDL (vezi figurile 4B și 4C). Profilurile trigliceridelor au prezentat un model similar (vezi figurile 5A, 5B și 5C).

Aceste date sunt în concordanță cu scăderile observate ale nivelurilor individuale de colesterol total și trigliceride ale animalelor în timpul studiului.

ZONA LEZIUNII DE ATEROSCLEROZA

Zona leziunii aterosclerotice este rezumată în Tabelul 6 și în Figurile 6A și 6B. Valorile sunt zone de leziune absolute în rădăcina aortică pe secțiune transversală și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 6

Aria leziunii pe secțiune transversală (*1000 μm^2)		
Timp (săptămâni))		t=13
Control AB	AVG	216.1
	SD	49.3
Evinacumab	AVG	133.0
	SD	52.8
Aria leziunii: Valoare-P		t=13
Control vs. evinacumab		0.001
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney		

Suprafața totală a leziunii din rădăcina aortică a grupului de control a fost de 216082 μm^2 pe secțiune transversală la sacrificiu la t=13 săptămâni. Tratamentul cu evinacumab a scăzut semnificativ suprafața totală a leziunii cu 39% ($p<0,001$) în comparație cu grupul de control la sacrificiu.

ATEROSCLEROZA: NUMĂR DE LEZIUNI

Numărul de leziuni aterosclerotice pe secțiune transversală este rezumat în Tabelul 7. Valorile sunt valori absolute (numărul de leziuni) și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 7

Număr de leziuni pe secțiune transversală (*1000 μm^2)		
Timp (săptămâni)		t=13
Control AB	AVG	5.0
	SD	0.8
Evinacumab	AVG	5.0
	SD	1.1
Număr de leziuni: Valoare-P		t=13
Control vs. evinacumab		0.880
Analiza neparametrică: Test U Mann Whitney		

Nu au existat diferențe în numărul de leziuni între grupul tratat cu evinacumab în comparație cu grupul de control.

ATEROSCLEROZA: GRAVITATEA LEZIUNII

Rezultatele severității leziunii aterosclerotice sunt rezumate în Tabelul 8. Valorile sunt procente din totalul leziunilor și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 8

Severitatea leziunii (%)			
Timp (săptămâni)		Leziuni ușoare (Tip I-III)	Leziuni severe (Tip IV-V)
Control AB	AVG	27.7	72.3
	SD	10.6	10.6
Evinacumab	AVG	36.8	63.2
	SD	26.8	26.8
Severitatea leziunii: Valoare-P		Mild (I-III)	Severe (IV-V)
Control vs. evinacumab		0.451	0.451
Analiza neparametrică: Test U Mann Whitney			

Nu au existat diferențe în severitatea leziunii între grupul tratat cu evinacumab în comparație cu grupul de control.

ATEROSCLEROZA: SEGMENTE NEAFECTATE

Numărul de segmente aterosclerotice neafectate este rezumat în Tabelul 9. Valorile reprezintă procentul de segmente non-aterosclerotice („neafectate” sau sănătoase). Valorile sunt medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 9

Segmente neafectate (%)		
Timp (săptămâni)		t=13
Control AB	AVG	2.4
	SD	8.9
Evinacumab	AVG	2.8
	SD	8.7
Segmente neafectate: Valoare-P		t=13
Control vs. evinacumab		0.813
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney		

Nu au existat diferențe în cantitatea de segmente neafectate între grupul tratat cu evinacumab în comparație cu grupul de control.

ATEROSCLEROZA: CONȚINUT DE MACROFAGE

Conținutul de macrofage al leziunilor este rezumat în Tabelul 10 și Figura 7A. Valorile sunt valori absolute ($\mu\text{m}^2 \cdot 1000$) sau valori relative (% din leziune) și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 10

		Aria macrofagelor/secțiune transversală ($\mu\text{m}^2 \times 1000$)		Conținut de macrofage (% din leziune)	
		Tip III - V	Tip IV - V	Tip III - V	Tip IV - V
Control AB	AVG	25.9	22.7	12.9	12.1
	SD	8.3	8.3	4.7	4.9
Evinacumab	AVG	19.3	15.9	17.2	14.6
	SD	9.7	10.6	7.7	5.6
Aria macrofagelor: Valoare- P		Aria macrofagelor/secțiune transversală ($\mu\text{m}^2 \times 1000$)		Conținut de macrofage (% din leziune)	
		Tip III - V	Tip IV - V	Tip III - V	Tip IV - V
Control vs. evinacumab		0.070	0.070	0.102	0.227
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney					

Tratamentul cu evinacumab a avut tendința de a scădea conținutul de macrofage pe secțiune transversală în leziunile aterosclerotice de tip IV-V în comparație cu grupul de control. Această diferență nu a fost observată, totuși, după corecția pentru zona totală a leziunii și exprimată ca procent de macrofage în leziunile de tip IV-V (Figura 7A).

ATEROSCLEROZA: CONTINUT NECROTIC

Conținutul necrotic al leziunilor este rezumat în Tabelul 11 și Figura 7A. Valorile sunt valori absolute ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) sau valori relative (% din leziune) și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 11

		Aria necrotică/secțiune transversală($\mu\text{m}^2 \times 1000$)		Conținut necrotic (% din leziune)	
		Tip III - V	Tip IV - V	Tip III - V	Tip IV - V
Control AB	AVG	19.4	18.8	8.8	9.0
	SD	10.2	10.2	3.4	3.6
Evinacumab	AVG	6.0	5.8	4.5	4.9
	SD	3.8	3.9	2.0	1.8
Aria necrotică: Valoare-P		Aria necrotică/secțiune transversală($\mu\text{m}^2 \times 1000$)		Conținut necrotic (% din leziune)	
		Tip III - V	Type IV-V	Tip III - V	Tip IV - V
Control vs. evinacumab		<0.001	<0.001	<0.001	0.001
Analiză neparametrică: Test U Mann Whitney					

Tratamentul cu evinacumab a scăzut semnificativ conținutul necrotic pe secțiune transversală în leziunile aterosclerotice de tip IV-V comparativ cu grupul de control (cu 69%, $p < 0,001$). După corecția pentru zona totală a leziunii, procentul zonei necrotice în leziunile de tip IV-V a fost, de asemenea, semnificativ scăzut în comparație cu grupul de control (cu 45%, $p = 0,001$) (Figura 7A).

ATEROSCLEROZA: CELULELE MUSCULARE NETEDE ÎN CAPACUL FIBROTIC

Cuantificarea celulelor musculare netede (SMC) în capacul fibrotic al leziunilor este rezumată în Tabelul 12 și Figura 7B. Valorile sunt valori absolute ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) sau valori relative (% din leziune) și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 12

		Aria SMC/secțiune transversala ($\mu\text{m}^2 \times 1000$)		SMC (% din leziune)	
		Tip III - V	Type IV-V	Tip III - V	Tip IV - V
Control AB	AVG	24.9	23.4	12.1	12.1
	SD	7.7	7.7	3.2	3.3
Evinacumab	AVG	15.8	14.4	13.5	13.7
	SD	7.5	8.0	4.2	4.6
Aria SMC: Valoare -P		Aria SMC/secțiune transversala ($\mu\text{m}^2 \times 1000$)		Conținut SMC (% din leziune)	
		Tip III - V	Tip IV - V	Tip III - V	Tip IV - V
Control vs. evinacumab		0.005	0.009	0.217	0.210
Analiza neparametrică: Test U Mann Whitney					

Tratamentul cu evinacumab a scăzut semnificativ aria celulelor musculare netede (SMC) pe secțiune transversală în leziunile aterosclerotice de tip IV-V în comparație cu grupul de control (cu 39%, $p = 0,009$). Cu toate acestea, după corecția pentru leziunea totală, procentul de SMC din capacul fibrotic în leziunile de tip IV-V nu a scăzut semnificativ în comparație cu grupul de control (Figura 7B).

ATEROSCLEROZA: CONȚINUT DE COLAGEN

Conținutul de collagen al leziunilor este rezumat în Tabelul 13 și Figura 7B. Valorile sunt valori absolute ($\mu\text{m}^2 \cdot 1000$) sau valori relative (% din leziune) și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 13

		Aria de collagen/secțiune transversală ($\mu\text{m}^2 \cdot 1000$)		Conținut de collagen (% din leziune)	
		Tip III - V	Tip IV - V	Tip III - V	Tip IV - V
Control AB	AVG	102.6	96.9	48.7	48.5
	SD	34.0	34.7	8.7	9.2
Evinacumab	AVG	62.0	58.1	48.7	52.3
	SD	29.2	30.5	10.3	8.2
Aria de collagen: Valoare-P		Aria de collagen/secțiune transversală ($\mu\text{m}^2 \cdot 1000$)		Conținut de collagen (% din leziune)	
		Tip III - V	Tip IV - V	Tip III - V	Tip IV - V
Control vs. evinacumab		0.005	0.009	0.813	0.227
Analiza neparametrică: Test U Mann Whitney					

Tratamentul cu evinacumab a scăzut semnificativ conținutul de collagen pe secțiune transversală în leziunile aterosclerotice de tip IV-V comparativ cu grupul de control (cu 40%, $p=0,009$). Cu toate acestea, după corecția pentru suprafața totală a leziunii, procentul de collagen în leziunile de tip IV-V nu a scăzut semnificativ în comparație cu grupul de control (Figura 7B).

ATEROSCLEROZA: ADEZIUNEA MONOCITARĂ

Procentul de monocite pe secțiune transversală este rezumat în Tabelul 14. Valorile sunt valori absolute (numărul de monocite aderente pe secțiune transversală) și exprimate ca medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 14

		Număr de monicite pe secțiune transversală
Control AB	AVG	3.4
	SD	1.2
Evinacumab	AVG	3.5
	SD	1.2
Monicite: Valoare-P		Număr de monicite pe secțiune transversală
Control vs. evinacumab		0.983
Analiza neparametrică , test U Mann Whitney		

Aderența monocitelor la endoteliul activat din peretele vasului rădăcinii aortice nu a fost afectată de tratamentul cu evinacumab în comparație cu grupul martor.

ATEROSCLEROZA: INDICE DE STABILITATE

Stabilitatea plăcii leziunilor (exprimată în termeni de indice de stabilitate) este rezumată în Tabelul 15. Indicele de stabilitate este definit ca suma a markerilor de stabilizare SMC și a conținutului de colagen împărțită la suma markerilor de destabilizare a conținutului de macrofage și necrotic. Această valoare oferă o măsură pentru stabilitatea plăcii. Valorile sunt medii $\pm$ S.D. de 14-15 șoareci per grup.

TABELUL 15

		Indice de stabilitate în tipul IV - V
		% SMC + % colagen)/(% macrofage + % necroze)
Control AB	AVG	3.2
	SD	1.3
Evinacumab	AVG	3.7
	SD	1.7
Index de stabilitate: Valoare-P		Indice de stabilitate în tipul IV - V
		% SMC + % colagen)/(% macrofage + % necroze)
Control vs. evinacumab		0.329
Analiza neparametrică: Test U Mann Whitney		

Tratamentul cu evinacumab nu a avut un efect asupra indicelui de stabilitate în comparație cu grupul de control.

REZUMAT

ASPECTE DE SECURITATE

Nu s-au observat efecte asupra greutateii corporale (creștere) și a aportului alimentar de tratament cu evinacumab în comparație cu controlul.

REDUCEREA NIVELURILOR VLDL SI LDL

APOE*3 Leiden. Șoarecii CETP sunt un model bine stabilit pentru familial disbetalipoproteinemia (FD) la om, care se caracterizează prin acumularea de lipoproteine rămase și o creștere a raportului VLDL-C la LDL-C. Profilul lipoproteinelor în APOE*3Leiden. Șoarecii CETP reflectă pe cel al pacienților cu FD cu un răspuns similar la terapiile de modificare a lipidelor. Acest lucru este ilustrat de o reducere comparabilă a colesterolului în toate scăderile de lipoproteine care conțin apoB cu tratamentul cu statine 25 și fenofibrat și niacină.

În studiul de față, tratamentul cu evinacumab a scăzut semnificativ colesterolul total mediu (TC) (-52%, $p < 0,001$) și trigliceridele (TG) (-84%, $p < 0,001$) în comparație cu controlul, care a fost limitat la non-fracții HDL.

REDUCEREA DIMENSIUNII LEZIUNII ȘI A ZONEI NECROTICE

În studiul actual, evinacumab a scăzut semnificativ dimensiunea leziunii (-39%, $p < 0,001$) în comparație cu grupul de control. Nu au fost găsite diferențe semnificative în ceea ce privește numărul de leziuni, segmentele neafectate sau severitatea leziunii.

Tratamentul cu evinacumab a scăzut semnificativ conținutul necrotic ca procent din dimensiunea totală a leziunii în leziunile severe de tip IV-V (cu 45%, $p = 0,001$), dar nu a afectat conținutul de macrofage, conținutul de colagen sau zona SMC, rezultând o stabilitate similară a leziunii. index ca grup de control. Evinacumab nu a afectat recrutarea monocitelor la endoteliul activat.

Conținutul necrotic a fost singurul marker al compoziției plăcii care a fost modificat atât în ceea ce privește suprafața absolută, cât și ca procent din suprafața totală a leziunii. O explicație potențială poate fi o schimbare a compoziției populației de macrofage din placă de la macrofagele M1 „ucigașe” mai proinflamatorii la macrofagele M2 „reparatorie” mai vindecătoare, care pot elimina colesterolul din placă.

CONCLUZIE

Rezultatele prezentate în acest exemplu, în mod colectiv, arată că anticorpul monoclonal anti-ANGPTL3, evinacumab, scade lipidele plasmatice și previne progresia aterosclerozei în APOE*3Leiden.șoareci CETP. Evinacumab nu a avut un efect asupra numărului de leziuni, severității leziunii sau stabilității plăcii, dar a redus semnificativ zona leziunii și zona centrală necrotică.