

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 448 426

a nome: Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

a: Tarrytown, NY 10591 - USA

dal titolo: Metodi per il trattamento di pazienti con ipercolesterolemia familiare.

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda il campo dei trattamenti terapeutici di malattie e disturbi associati a livelli elevati di lipidi e lipoproteine. Più specificamente, l'invenzione riguarda l'uso di un inibitore di ANGPTL3 con terapie concomitanti di riduzione dei lipidi per il trattamento di pazienti con ipercolesterolemia familiare al fine di raggiungere livelli sierici ottimali di lipidi e lipoproteine.

PRECEDENTE

L'iperlipidemia è un termine generale che comprende malattie e disturbi caratterizzati o associati a livelli elevati di lipidi e/o lipoproteine nel sangue. Le iperlipidemie comprendono l'ipercolesterolemia, l'ipertrigliceridemia, l'iperlipidemia combinata e l'aumento della lipoproteina a (Lp(a)). Una forma di

iperlipidemia particolarmente diffusa in molte popolazioni è l'ipercolesterolemia.

L'ipercolesterolemia, in particolare l'aumento dei livelli di colesterolo a bassa densità (LDL) (LDL-C), costituisce un rischio importante per lo sviluppo dell'aterosclerosi e della malattia coronarica (CHD) (Sharrett *et al.*, 2001, *Circulation* 104:1108-1113). Il colesterolo delle lipoproteine a bassa densità è identificato come il bersaglio primario della terapia di riduzione del colesterolo ed è accettato come un valido endpoint terapeutico surrogato. Numerosi studi hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di LDL-C riduce il rischio di CHD, con una forte relazione diretta tra i livelli di LDL-C e gli eventi CHD; per ogni riduzione di 1 mmol/L (~40 mg/dL) di LDL-C, la mortalità e la morbilità per malattie cardiovascolari (CVD) si riducono del 22%. Una maggiore riduzione dell'LDL-C produce una maggiore riduzione degli eventi e i dati comparativi tra il trattamento intensivo e quello standard con statine suggeriscono che più basso è il livello di LDL-C, maggiore è il beneficio nei pazienti a rischio cardiovascolare (CV) molto elevato. L'ipercolesterolemia familiare (FH) è un disturbo ereditario del metabolismo lipidico che predispone una persona a gravi malattie cardiovascolari (CVD)

premature (Kolansky *et al.*, (2008), *Am J Cardiology*, 102(11):1438-1443). La FH può essere una malattia autosomica dominante o autosomica recessiva che deriva da mutazioni nel recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR), o in almeno 3 diversi geni che codificano per proteine coinvolte nella clearance epatica delle LDL-C, che possono causare la FH. Esempi di tali difetti sono le mutazioni nel gene che codifica per il recettore LDL (LDLR), che rimuove le LDL-C dalla circolazione, e nel gene per l'apolipoproteina (Apo) B, che è la proteina principale della particella LDL. In tutti i casi, la FH è caratterizzata da un accumulo di LDL-C nel plasma fin dalla nascita e dal successivo sviluppo di xantomi tendinei, xantelasmi, ateromi e CVD. La FH può essere classificata come FH eterozigote (heFH) o FH omozigote (hoFH), a seconda che l'individuo presenti un difetto genetico in una (eterozigote) o in entrambe (omozigote) le copie del gene implicato. Gli attuali farmaci che riducono l'LDL-C includono statine, inibitori dell'assorbimento del colesterolo, fibrati, niacina, sequestranti degli acidi biliari e inibitori della Proproteina Convertasi Subtilisina/Kexin Tipo 9 (PCSK9). Le statine sono un trattamento comunemente prescritto per la riduzione dell'LDL-C. Tuttavia, nonostante la disponibilità di

tali terapie per la riduzione dei lipidi, molti pazienti ad alto rischio non riescono a raggiungere il livello target di LDL-C previsto dalle linee guida (Gitt et al., 2010, Clin Res Cardiol 99(11):723-733). Per i pazienti che non sono ancora in grado di raggiungere il livello target delle linee guida per l'LDL-C, nonostante la terapia modificante i lipidi (LMT) disponibile, viene talvolta prescritta la rimozione meccanica dell'LDL-C mediante aferesi delle lipoproteine (*ad esempio*, aferesi delle LDL). Hartgers et al (2015) Curr Cardiol Rep, 17, 109 divulgano approcci per il rilevamento e il trattamento dell'ipercolesterolemia familiare. EP 3439689 divulga metodi di trattamento dell'iperlipidemia con un inibitore di ANGPTL8 e un inibitore di ANGPTL3. WO 2017/151783 divulga metodi di trattamento dell'iperlipidemia che utilizzano un inibitore di PCSK9 in combinazione con un inibitore di ANGPTL3. I pazienti che non raggiungono l'obiettivo di LDL-C nonostante ricevano un regime ottimizzato di LMT, trarrebbero grande beneficio da terapie alternative per la riduzione di LDL-C, o dall'uso di una combinazione di agenti terapeutici, come gli agenti e i regimi qui descritti.

BREVE SINTESI DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda un inibitore di ANGPTL3 da utilizzare nei metodi di trattamento di pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare in combinazione con altre terapie modificanti i lipidi per raggiungere livelli ottimali di lipidi e lipoproteine nel siero.

In particolare, l'invenzione fornisce un inibitore di ANGPTL3 da utilizzare in un metodo di trattamento di un paziente affetto da ipercolesterolemia familiare in combinazione con una statina e con due agenti di riduzione di lipidi diversi da una statina, in cui il metodo comprende la somministrazione al paziente di una quantità terapeuticamente efficace di statina, dei due agenti di riduzione di lipidi diversi da una statina e di un inibitore di ANGPTL3, in cui

l'inibitore di ANGPTL3 è evinacumab;

la statina è selezionata dal gruppo costituito da atorvastatina, pitavastatina, lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina e rosuvastatina; e

il primo agente di riduzione di lipidi diverso da una statina è un agente che inibisce l'assorbimento del colesterolo

In una forma di realizzazione, l'ipercolesterolemia familiare è selezionata dal gruppo costituito da

ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) e ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH).

In una forma di realizzazione, la statina è la rosuvastatina, che viene somministrata per via orale una volta al giorno a una dose compresa tra circa 5 mg e circa 40 mg. In un'altra forma di realizzazione, la statina è la rosuvastatina, somministrata per via orale una volta al giorno a una dose di 5-40 mg.

In una forma di realizzazione, la statina è l'atorvastatina, che viene somministrata per via orale una volta al giorno a una dose compresa tra circa 10 mg e circa 80 mg. In un'altra forma di realizzazione, la statina è atorvastatina, somministrata per via orale una volta al giorno alla dose di 10-80 mg.

In una forma di realizzazione, l'agente che inibisce l'assorbimento del colesterolo è l'ezetimibe.

In una forma di realizzazione, l'ezetimibe viene somministrato per via orale una volta al giorno alla dose di circa 10 mg. In un'altra forma di realizzazione, l'ezetimibe viene somministrato per via orale una volta al giorno alla dose di 10 mg.

In una forma di realizzazione, il secondo agente di riduzione di lipidi diverso da una statina è un agente che inibisce la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTTP).

In una forma di realizzazione, l'agente che inibisce la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi è la lomitapide.

In una forma di realizzazione, la lomitapide viene somministrata per via orale una volta al giorno a una dose compresa tra circa 5 mg e circa 60 mg. In un'altra forma di realizzazione, la lomitapide viene somministrata per via orale una volta al giorno alla dose di 5-60 mg.

In una forma di realizzazione, la lomitapide viene somministrata per via orale una volta al giorno alla dose di circa 20 mg. In un'altra forma di realizzazione, la lomitapide viene somministrata per via orale una volta al giorno alla dose di 20 mg.

In una forma di realizzazione, evinacumab viene somministrato prima, durante o dopo il trattamento con una statina, ezetimibe, lomitapide, mipomersen, un inibitore di PCSK9 o qualsiasi altro agente di riduzione di lipidi ritenuto utile per ottenere la normalizzazione di almeno un parametro lipidico qui descritto.

In una forma di realizzazione, evinacumab viene somministrato per via endovenosa a una dose compresa tra circa 1 mg/kg e circa 20 mg/kg di peso corporeo.

In una forma di realizzazione, evinacumab viene

somministrato per via endovenosa a una dose di circa 15 mg/kg di peso corporeo. In un'altra forma di realizzazione, evinacumab viene somministrato per via endovenosa a una dose di 15 mg/kg di peso corporeo.

In una forma di realizzazione, evinacumab viene somministrato per via sottocutanea a una dose compresa tra circa 50 mg e circa 750 mg.

In una forma di realizzazione, evinacumab viene somministrato per via sottocutanea a una dose compresa tra circa 250 mg e circa 450 mg.

In una forma di realizzazione, evinacumab viene somministrato ogni settimana, ogni due settimane, ogni 3 settimane, ogni 4 settimane, ogni 2 mesi, ogni 3 mesi o ogni 4 mesi.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Prima di descrivere la presente invenzione, si deve comprendere che essa non è limitata a particolari metodi e condizioni sperimentali descritti, in quanto tali metodi e condizioni possono variare. Si precisa inoltre che la terminologia usata nel presente documento ha il solo scopo di descrivere particolari forme di realizzazione e non è da intendersi come limitativa, poiché l'ambito della presente invenzione sarà limitato solo dalle rivendicazioni allegate.

A meno che non sia diversamente definito, tutti i

termini tecnici e scientifici qui usati hanno generalmente lo stesso significato comunemente inteso da un esperto della tecnica a cui appartiene la presente invenzione. Come usato nel presente documento, il termine "circa", se usato in riferimento a un particolare valore numerico citato, significa che il valore può variare dal valore citato di non più dell'1%. Per esempio, come usata nella presente, l'espressione "circa 100" include 99 e 101 e tutti i valori compresi tra essi (per esempio, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, eccetera).

Sebbene nella pratica o nella sperimentazione della presente invenzione possano essere utilizzati metodi e materiali simili o equivalenti a quelli descritti nel presente documento, di seguito vengono descritti i metodi e i materiali preferiti.

Metodi per il trattamento di Iperlipidemie

La presente invenzione riguarda un inibitore di ANGPTL3 da utilizzare per ridurre i livelli di lipoproteine in pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare, somministrando una combinazione dell'inibitore di ANGPTL3 e (a) una statina; (b) una prima terapia di riduzione dei lipidi diversa da una statina; e (c) un secondo agente di riduzione dei lipidi diverso da una statina. Il primo agente di

riduzione di lipidi che non è una statina è un agente che inibisce l'assorbimento del colesterolo, come l'ezetimibe (ZETIA®). In alcune forme di realizzazione, il secondo agente di riduzione di lipidi che non è una statina è un agente che inibisce la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi, come la lomitapide (JUSTAPID®). L'inibitore di ANGPTL3 è un anticorpo che si lega specificamente a ANGPTL3, in particolare evinacumab. In alcune forme di realizzazione dell'invenzione, il trattamento con la combinazione di un inibitore di ANGPTL3 (evinacumab) con le altre terapie sopra menzionate (statina, ezetimibe e lomitapide) può servire ad abbassare i livelli di lipoproteine in questi pazienti fino a un intervallo accettabile, riducendo così il rischio di sviluppare aterosclerosi, ictus e altre malattie cardiovascolari. In alcune forme di realizzazione, i metodi descritti possono essere utilizzati per trattare pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare, compresa l'ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) e/o l'ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH). In alcune forme di realizzazione, un inibitore della PCSK9 può essere aggiunto alle terapie combinate sopra descritte per ridurre ulteriormente il livello di

almeno uno dei parametri lipidici qui descritti. In una forma di realizzazione correlata, la combinazione di terapie sopra descritte può essere utilizzata anche in pazienti sottoposti ad aferesi per ottenere la normalizzazione di almeno uno dei parametri lipidici descritti. La combinazione di terapie descritte può eliminare la necessità di aferesi o può aumentare l'intervallo di tempo tra la necessità di procedure di aferesi. La combinazione di terapie descritta, se usata da sola o in combinazione con l'aferesi, può servire a ridurre il rischio di sviluppo dell'aterosclerosi e della cardiopatia coronarica (CHD) in questi pazienti.

Come usato qui, il termine "lipoproteina" indica una particella biomolecolare contenente sia proteine sia lipidi. Esempi di lipoproteine sono, *ad esempio*, le lipoproteine a bassa densità (LDL), le lipoproteine ad alta densità (HDL), le lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), le lipoproteine a densità intermedia (IDL) e le lipoproteine (a) (Lp(a)).

La presente invenzione, secondo alcune forme di realizzazione, comprende il trattamento di pazienti non responsivi, non sono adeguatamente controllati o sono intolleranti a terapie modificanti i lipidi, diverse da quelle descritte e incluse nella

combinazione qui descritta. Come usato nel presente documento, un particolare paziente "non responsivo, non adeguatamente controllato o intollerante alla terapia di modifica dei lipidi" è determinato da un medico, un assistente medico, un diagnosta o un altro professionista medico sulla base del livello di una o più lipoproteine (*ad esempio*, LDL-C e/o non-HDL-C) misurato o altrimenti rilevato nel siero del paziente dopo il trattamento con l'agente modificante dei lipidi. Il medico, l'assistente medico, il diagnosta o altro professionista sanitario può anche determinare se il paziente è intollerante a determinate terapie modificanti i lipidi in base al profilo degli effetti collaterali delle terapie modificanti i lipidi, che il paziente può sperimentare, tra cui, ma senza limitazioni, dolori muscolari, tenerezza o debolezza (mialgia), cefalea, arrossamento della pelle, difficoltà a dormire, crampi addominali, gonfiore, diarrea, costipazione, eruzione cutanea, nausea o vomito. Un paziente non responsivo, non adeguatamente controllato o intollerante a determinate terapie modificanti i lipidi può essere determinato o influenzato anche da altri fattori, come l'anamnesi familiare del paziente, il suo background medico, lo stato attuale del trattamento terapeutico, nonché gli

obiettivi di lipoproteine generalmente accettati o prevalenti adottati dalle associazioni mediche nazionali e dai gruppi di medici. Ad esempio, in alcuni contesti, se un paziente è in terapia con un determinato agente modificatore dei lipidi e presenta un livello di LDL-C maggiore o uguale a circa 70 mg/dL, ciò indica che il paziente è "non responsivo, o non adeguatamente controllato, o intollerante a quella terapia modificatrice dei lipidi" e può trarre beneficio dal trattamento con le terapie qui descritte. In altri contesti, se un paziente è in terapia con un determinato agente modificatore dei lipidi e presenta un livello di LDL-C maggiore o uguale a circa 100 mg/dL, ciò indica che il paziente è "non responsivo, non adeguatamente controllato o intollerante a quella terapia modificatrice dei lipidi" e può trarre beneficio dal trattamento con le terapie qui descritte. In alcuni contesti, se un paziente è in terapia con un determinato agente modificante dei lipidi e presenta un livello di LDL-C maggiore o uguale a circa 150 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL, 300 mg/dL, 400 mg/dL o superiore, ciò indica che il paziente è "non responsivo, non adeguatamente controllato o intollerante a una determinata terapia modificante dei lipidi" e può trarre beneficio dal

trattamento con le terapie qui descritte. In ancora altri contesti, il raggiungimento o meno di una particolare percentuale di riduzione del livello di LDL-C o non-HDL-C rispetto al livello di LDL-C o non-HDL-C del paziente a un particolare punto di partenza ("basale") può essere utilizzato per determinare se il paziente ha risposto a una terapia modificante i lipidi o se ha bisogno di un ulteriore trattamento utilizzando la presente invenzione. Ad esempio, una riduzione dell'LDL-C o del non-HDL-C inferiore al 50% (ad esempio, inferiore al 40%, inferiore al 35%, inferiore al 30%, inferiore al 25%, ecc.) rispetto al basale può indicare la necessità di una terapia con l'invenzione. La presente invenzione prevede quindi la somministrazione di una o più dosi di un inibitore di ANGPTL3 (evinacumab) e di una o più dosi di una combinazione di statina, ezetimibe, inibitore della PCSK9, mipomersen e/o lomitapide a un paziente che sta seguendo altri tipi di terapia modificante i lipidi (ad esempio, sequestranti degli acidi biliari, niacina, fenofibrato), ma che non risponde a tale terapia o è intollerante a tale terapia, in cui, dopo aver ricevuto una o più dosi della terapia combinata qui descritta, il paziente è in grado di raggiungere livelli normali di colesterolo totale, LDL-C, o non-

HDL-C. In alcuni casi, il paziente può essere sospeso dall'altra terapia modificante i lipidi, oppure l'altra terapia modificante i lipidi può essere continuata, ma può essere somministrata a dosi inferiori e può essere utilizzata in combinazione con l'inibitore di ANGPTL3 e una statina più ezetimibe e lomitapide e, facoltativamente, un inibitore della PCSK9 e/o mipomersen per raggiungere e/o mantenere un particolare livello lipoproteico target. In alternativa, al paziente può essere somministrata l'altra terapia modificante i lipidi alla normale dose prescritta, ma la frequenza di somministrazione dell'altra terapia modificante i lipidi può essere ridotta se l'altra terapia modificante i lipidi deve essere somministrata insieme alla combinazione qui descritta. In alcune forme di realizzazione, la necessità di trattare il paziente con un'altra terapia modificante i lipidi per raggiungere e/o mantenere un particolare livello lipoproteico target può essere eliminata del tutto dopo la somministrazione di una o più dosi delle terapie combinate qui descritte.

Secondo alcune forme di realizzazione, la presente invenzione comprende la riduzione o l'eliminazione della necessità di alcune terapie modificanti i lipidi, dove i metodi comprendono la selezione di un

paziente con iperlipidemia (ad esempio, ipercolesterolemia) che è stato trattato con alcune terapie modificanti i lipidi nell'ultimo mese, negli ultimi 2 mesi, negli ultimi 3 mesi, negli ultimi 4 mesi, negli ultimi 5 mesi, negli ultimi 6 mesi o per un periodo più lungo, e somministrare al paziente una o più dosi di un inibitore di ANGPTL3 in combinazione con gli agenti qui descritti (ezetimibe, lomitapide e una statina). I metodi secondo questo aspetto dell'invenzione consentono di abbassare il livello di almeno un lipide o di una lipoproteina nel siero del paziente e, di conseguenza, di ridurre o eliminare la necessità di un trattamento con l'altra terapia modificante i lipidi alla quale il paziente non ha risposto (per esempio un sequestrante degli acidi biliari, la niacina o il fenofibrato) o per la quale il paziente ha mostrato un'intolleranza. I metodi qui descritti possono essere utilizzati anche in pazienti sottoposti ad aferesi e la combinazione di agenti per la riduzione dei lipidi utilizzata in questa popolazione di pazienti può portare all'eliminazione della necessità di aferesi o può aumentare l'intervallo di tempo tra le procedure di aferesi. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione della presente invenzione, in seguito alla somministrazione

di una o più dosi di un inibitore dell'ANGPLT3 in combinazione con una statina, ezetimibe e/o lomitapide, il livello sierico di LDL-C del paziente si riduce a meno di un livello definito (*ad esempio* meno di 100 mg/dL o meno di 70 mg/dL), o il colesterolo totale è ridotto a un livello definito (*ad esempio* meno di 200 mg/dL, o meno di 150 mg/dL, o il livello sierico di LDL-C mostra una riduzione di almeno il 40% rispetto ai livelli basali prima del trattamento con la combinazione qui descritta.

Secondo alcune forme di realizzazione, il paziente che è trattabile nella presente invenzione ha un'ipercolesterolemia (*ad esempio*, una concentrazione sierica di LDL-C maggiore o uguale a 70 mg/dL (*ad esempio* se il paziente ha una storia di eventi cardiovascolari), o una concentrazione sierica di LDL-C maggiore o uguale a 100 mg/dL (*ad esempio* se il paziente non ha una storia di eventi cardiovascolari)).

In alcune forme di realizzazione, l'ipercolesterolemia del paziente non è adeguatamente controllata da alcune terapie standard che modificano i lipidi, come i sequestranti degli acidi biliari, la niacina o i fenofibrati. La presente invenzione può anche ridurre il colesterolo totale, l'LDL-C, il non-HDL-C, i trigliceridi (TG), l'ApoB, l'ApoCIII e l'Lp(a) in un

paziente affetto da ipercolesterolemia familiare, comprese HeFH e HoFH.

Pazienti idonei al trattamento

La presente divulgazione include metodi e composizioni utili per il trattamento di pazienti a cui è stata diagnosticata o che sono stati identificati come a rischio di sviluppare una condizione di ipercolesterolemia come, *ad esempio* Ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) o omozigote (HoFH) derivante da mutazioni nel recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR), ipercolesterolemia autosomica dominante (ADH, *ad esempio*, ADH associata a una o più mutazioni gain-of-function nel gene PCSK9), presenza documentata di mutazioni omozigoti o eterozigoti composte nel gene Apo B, ipercolesterolemia autosomica recessiva (ARH, *ad esempio*, ARH associata a mutazioni in LDLRAP1), nonché incidenze di ipercolesterolemia distinte dall'ipercolesterolemia familiare (non FH). Nell'invenzione, il paziente è affetto da ipercolesterolemia familiare. Un paziente idoneo al trattamento può includere anche pazienti che presentano mutazioni LDLR che rientrano in una delle seguenti classi: Classe I: Mutazioni del recettore nullo, per cui l'LDLR non viene sintetizzato affatto;

Classe II: Alleli con difetti di trasporto, per cui l'LDLR non viene trasportato correttamente dal reticolo endoplasmatico all'apparato di Golgi per essere espresso sulla superficie cellulare (classe IIA (assenza di trasporto del recettore) e classe IIB (trasporto ridotto del recettore)); classe III: Alleli con difetto di legame, per cui LDLR non lega correttamente le LDL sulla superficie cellulare a causa di un difetto dell'apolipoproteina B100 (R3500Q) o di LDL-R; Classe IV: Alleli difettosi di internalizzazione per cui l'LDLR legato alle LDL non si raggruppa correttamente nelle fosse rivestite di clatrina per l'endocitosi mediata dal recettore; classe V: Alleli difettosi di riciclaggio, per cui l'LDLR non viene riciclato sulla superficie cellulare.

La diagnosi di ipercolesterolemia familiare (ad esempio, heFH o hoFH) può essere effettuata mediante genotipizzazione e/o criteri clinici. Per i pazienti non genotipizzati, la diagnosi clinica può essere basata sui criteri di Simon Broome, con un criterio di FH definita, o sui criteri WHO/Dutch Lipid Network, con un punteggio > 8 punti.

Secondo alcune forme di realizzazione, un paziente può essere idoneo al trattamento sulla base di una storia di malattia coronarica (CHD). Come usato in questo

documento, "precedenti di CHD" (o "precedenti documentati di CHD") include uno o più dei seguenti elementi: (i) infarto miocardico acuto (MI); (ii) MI silente; (iii) angina instabile; (iv) procedura di rivascolarizzazione coronarica (ad esempio, intervento coronarico percutaneo [PCI] o intervento chirurgico di bypass aorto-coronarico [CABG]); e/o (v) CHD clinicamente significativa diagnosticata mediante test invasivi o non invasivi (ad esempio, angiografia coronarica, test da sforzo con treadmill, ecocardiografia da sforzo o imaging nucleare).

Secondo alcune forme di realizzazione, un paziente può essere idoneo al trattamento sulla base della presenza di una malattia cardiovascolare non coronarica ("non-CHD CVD"). Come usato nel presente documento, "CVD non CHD" comprende uno o più dei seguenti elementi: (i) precedente ictus ischemico documentato con un deficit neurologico ischemico focale persistente per più di 24 ore, considerato di origine aterotrombotica; (ii) arteriopatia periferica; (iii) aneurisma dell'aorta addominale; (iv) stenosi aterosclerotica dell'arteria renale; e/o (v) malattia della carotide (attacchi ischemici transitori o ostruzione >50% di un'arteria carotidea).

Secondo alcune forme di realizzazione, un paziente può

essere idoneo al trattamento sulla base della presenza di uno o più fattori di rischio aggiuntivi quali, *ad esempio*, (i) malattia renale cronica (CKD) moderata documentata, definita da $30 \leq \text{eGFR} < 60$ mL/min/1.73 m² per 3 mesi o più; (ii) diabete mellito di tipo 1 o 2 con o senza danni agli organi bersaglio (*ad esempio*, retinopatia, nefropatia, microalbuminuria); (iii) un rischio CVD fatale calcolato a 10 anni SCORE $\geq 5\%$ (Linee guida ESC/EAS per la gestione delle dislipidemie, Conroy et al., 2003, Eur. Heart J. 24:987-1003).

Secondo alcune forme di realizzazione, un paziente può essere idoneo al trattamento sulla base della presenza di uno o più fattori di rischio aggiuntivi selezionati dal gruppo costituito da età (*ad esempio*, età superiore a 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, o 80 anni), razza, origine nazionale, sesso (maschile o femminile), abitudini di esercizio fisico (*ad esempio*, praticante regolare, non praticante), altre condizioni mediche preesistenti (*ad esempio*, diabete di tipo II, pressione alta, eccetera) e stato attuale dei farmaci (*ad esempio*, attualmente si assumono betabloccanti, niacina, ezetimibe, fibrati, acidi grassi omega-3, resine di acidi biliari, eccetera).

Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, un soggetto trattabile può presentare un

livello elevato di uno o più marcatori infiammatori. Qualsiasi marcatore di infiammazione sistemica può essere utilizzato ai fini della presente invenzione. I marcatori infiammatori adatti includono, senza limitazioni, la proteina C-reattiva, le citochine (ad esempio, II-6, IL-8 e/o IL-17) e le molecole di adesione cellulare (ad esempio, ICAM-1, ICAM-3, BL-CAM, LFA-2, VCAM-1, NCAM e PECAM).

Secondo la presente invenzione, i pazienti possono essere idonei al trattamento sulla base di una combinazione di uno o più dei criteri o delle caratteristiche terapeutiche di cui sopra. Ad esempio, secondo alcune forme di realizzazione, un paziente idoneo al trattamento può essere ulteriormente selezionato sulla base della presenza di HeFH in combinazione con: (i) anamnesi di CHD documentata, (ii) CVD non CHD e/o (iii) diabete mellito con danno agli organi bersaglio; tali pazienti possono essere selezionati anche sulla base di una concentrazione sierica di LDL-C maggiore o uguale a 70 mg/dL.

Secondo alcune altre forme di realizzazione, un paziente idoneo al trattamento, oltre ad avere un'ipercolesterolemia non adeguatamente controllata da un regime terapeutico giornaliero di statine a dose moderata, può essere selezionato in base al fatto di

avere HeFH senza CHD o CVD non CHD, ma con (i) uno SCORE di rischio CVD fatale calcolato a 10 anni $\geq 5\%$; oppure (ii) diabete mellito senza danni agli organi bersaglio; tali pazienti possono anche essere selezionati sulla base di una concentrazione sierica di LDL-C maggiore o uguale a 100 mg/dL.

Secondo alcuni aspetti, il soggetto che può essere trattato con i metodi qui illustrati è un soggetto affetto da sindrome da chilomicronemia familiare (FCS; nota anche come deficit di lipoproteina lipasi).

Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, il soggetto trattabile è un soggetto che si sta sottoponendo o si è recentemente sottoposto ad aferesi delle lipoproteine (*ad esempio*, negli ultimi sei mesi, nelle ultime 12 settimane, nelle ultime 8 settimane, nelle ultime 6 settimane, nelle ultime 4 settimane, nelle ultime 2 settimane, eccetera).

Somministrazione di un inibitore di ANGPTL3 come terapia aggiuntiva

La presente divulgazione comprende metodi di trattamento in cui a un paziente che sta seguendo, o ha recentemente seguito, una terapia standard per la modifica dei lipidi (*ad esempio* una statina) viene somministrato un inibitore di ANGPTL3 secondo una particolare quantità e frequenza di dosaggio, e dove

l'inibitore di ANGPTL3 viene somministrato come aggiunta alla terapia modificante i lipidi preesistente del paziente (se applicabile), come ad esempio un'aggiunta al regime terapeutico giornaliero preesistente del paziente a base di statine, o ad un altro regime, ad esempio la niacina. L'invenzione include l'uso dell'inibitore di ANGPTL3 (evinacumab) come terapia aggiuntiva alle terapie che modificano i lipidi in aggiunta alle statine, compreso l'uso con ezetimibe e lomitapide per ottenere gli effetti massimi di riduzione dei lipidi. Ulteriori agenti per la riduzione dei lipidi da utilizzare nell'invenzione includono gli inibitori di PCSK9 o il mipomersen. La combinazione di agenti può essere utilizzata anche nei pazienti sottoposti ad aferesi per raggiungere livelli lipidici accettabili.

Ad esempio, i metodi della presente divulgazione includono regimi terapeutici aggiuntivi in cui l'inibitore di ANGPTL3 viene somministrato come terapia aggiuntiva allo stesso regime terapeutico giornaliero stabile di statine (ovvero, la stessa quantità di statine) che il paziente stava assumendo prima di ricevere l'inibitore di ANGPTL3. Oltre alla terapia con statina e anticorpo ANGPTL3, l'aggiunta di ezetimibe da solo o in combinazione con lomitapide

determina livelli significativamente più bassi di lipidi o lipoproteine sieriche quando viene somministrata la combinazione. In altri aspetti, gli inibitori di ANGPTL3 sono somministrati come terapia aggiuntiva a un regime terapeutico a base di statine che comprende una statina in quantità superiore o inferiore alla dose di statina che il paziente assumeva prima di ricevere l'inibitore di ANGPTL3 o la terapia combinata qui descritta. Ad esempio, dopo aver iniziato un regime terapeutico che comprende un inibitore di ANGPTL3 somministrato con particolari frequenze e quantità di dosaggio, oltre a ezetimibe e lomitapide, la dose giornaliera di statina somministrata o prescritta al paziente può (a) rimanere invariata, (b) aumentare o (c) diminuire (ad esempio, aumentare o diminuire) rispetto alla dose giornaliera di statina che il paziente assumeva prima di iniziare il regime terapeutico con l'inibitore di ANGPTL3, ezetimibe e/o lomitapide, a seconda delle esigenze terapeutiche del paziente.

Efficacia terapeutica

La presente invenzione può determinare la riduzione dei livelli sierici di uno o più componenti lipidici selezionati dal gruppo costituito da colesterolo totale, LDL-C, IDL, non-HDL-C, ApoB 100, ApoB 48, Apo

A-1, Apo CIII, VLDL-C, trigliceridi, Lp(a), chilomicroni, resti di chilomicroni e colesterolo residuo. Ad esempio, secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, la somministrazione di un inibitore di ANGPTL3 in combinazione con una statina, ezetimibe e lomitapide a un soggetto idoneo determinerà una riduzione percentuale media rispetto al basale del colesterolo lipoproteico a bassa densità (LDL-C) nel siero di almeno il 25%, 30%, 40%, 50%, 60% o superiore; una riduzione percentuale media rispetto al basale di ApoB di almeno il 25%, 30%, 40%, 50%, 60% o superiore; una riduzione percentuale media rispetto al basale di non-HDL-C di almeno il 25%, 30%, 40%, 50%, 60% o superiore; una riduzione percentuale media rispetto al basale del colesterolo totale di almeno il 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% o superiore; una riduzione percentuale media rispetto al basale del VLDL-C di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% o superiore; una riduzione percentuale media rispetto al basale dei trigliceridi di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% o superiore; e/o una riduzione percentuale media rispetto al basale della Lp(a) di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o superiore.

Inibitori di ANGPTL3

La presente invenzione comprende la somministrazione a un paziente di una composizione terapeutica che comprende evinacumab in combinazione con una statina, un inibitore dell'assorbimento del colesterolo (ad esempio ezetimibe) e un agente che inibisce la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (ad esempio lomitapide).

Come qui utilizzato, un "inibitore di ANGPTL3" è un qualsiasi agente che si lega o interagisce con ANGPTL3 umano e inibisce la normale funzione biologica di ANGPTL3 *in vitro* o *in vivo*. Esempi non limitativi di categorie di inibitori di ANGPTL3 includono antagonisti di ANGPTL3 a piccole molecole, inibitori dell'espressione o dell'attività di ANGPTL3 basati su acidi nucleici (ad esempio, siRNA o antisenso), molecole basate su peptidi che interagiscono specificamente con l'ANGPTL3 (ad esempio, peptibodies), molecole recettoriali che interagiscono specificamente con l'ANGPTL3, molecole scaffold che legano l'ANGPTL3 (ad esempio, DARPins, proteine ripetute HEAT, proteine ripetute ARM, proteine ripetute tetratricopeptidiche, costrutti scaffold basati sulla fibronectina e altri scaffold basati su proteine ripetute presenti in natura, ecc, [si veda, ad esempio, Boersma e Pluckthun, 2011, *Curr. Opin.*

Biotechnol. 22:849-857, e riferimenti ivi citati]), e aptameri anti-ANGPTL3 o loro porzioni. Secondo alcuni aspetti della divulgazione, gli inibitori di ANGPTL3 che possono essere utilizzati sono anticorpi anti-ANGPTL3 o frammenti di anticorpi che legano l'antigene in modo specifico all'ANGPTL3 umano.

Il termine "proteina-3 umana simile all'angiopoietina" o "ANGPTL3 umano" o "hANGPTL3", come qui utilizzato, si riferisce all'ANGPTL3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 9 (si veda anche NCBI Accession NP_055310), o un suo frammento biologicamente attivo.

Il termine "anticorpo", come qui utilizzato, si riferisce alle molecole di immunoglobuline che comprendono quattro catene polipeptidiche, due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) interconnesse da legami disolfuro, nonché ai loro multimeri (ad esempio, IgM). Ogni catena pesante comprende una regione variabile della catena pesante (abbreviata qui come HCVR o V_H) e una regione costante della catena pesante. La regione costante della catena pesante comprende tre domini, C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}. Ogni catena leggera comprende una regione variabile della catena leggera (abbreviata qui come LCVR o V_L) e una regione costante della catena leggera. La regione costante

della catena leggera comprende un dominio (C_{L1}). Le regioni V_H e V_L possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, denominate regioni determinanti la complementarità (CDR), intervallate da regioni più conservate, denominate regioni framework (FR). Ogni V_H e V_L è composta da tre CDR e quattro FR, disposti dall'ammino-terminale al carbossi-terminale nel seguente ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. In diversi aspetti della divulgazione, le FR dell'anticorpo (o della sua porzione legante l'antigene) possono essere identiche alle sequenze germinali umane o possono essere modificate naturalmente o artificialmente. Una sequenza di consenso degli amminoacidi può essere definita sulla base di un'analisi affiancata di due o più CDR.

Il termine "anticorpo", come usato nella presente, include anche frammenti leganti l'antigene di molecole anticorpali intere. I termini "porzione legante l'antigene" di un anticorpo, "frammento legante l'antigene" di un anticorpo e simili, come qui utilizzati, includono qualsiasi polipeptide o glicoproteina presente in natura, ottenibile enzimaticamente, sintetica o geneticamente ingegnerizzata che lega specificamente un antigene per

formare un complesso. I frammenti di un anticorpo che legano l'antigene possono essere derivati, *ad esempio*, da molecole di anticorpi completi utilizzando qualsiasi tecnica standard idonea, come la digestione proteolitica o tecniche di ingegneria genetica ricombinante che prevedono la manipolazione e l'espressione del DNA che codifica per domini variabili e facoltativamente costanti dell'anticorpo. Tale DNA è noto e/o è facilmente reperibile da, *ad esempio*, fonti commerciali, librerie di DNA (incluse, *ad esempio*, librerie di fago-anticorpi) oppure possono essere sintetizzate. Il DNA può essere sequenziato e manipolato chimicamente o utilizzando tecniche di biologia molecolare, ad esempio per disporre uno o più domini variabili e/o costanti in una configurazione adatta, oppure per introdurre codoni, creare residui di cisteina, modificare, aggiungere o eliminare amminoacidi, ecc.

Esempi non limitativi di frammenti leganti antigene includono: (i) frammenti Fab; (ii) frammenti F(ab')₂; (iii) frammenti Fd; (iv) frammenti Fv; (v) molecole Fv a catena singola (scFv); (vi) frammenti dAb; e (vii) unità di riconoscimento minime costituite da residui di amminoacidi che imitano la regione ipervariabile di un anticorpo (*ad esempio*, una regione di

determinazione della complementarità isolata (CDR) come un peptide CDR3) o un peptide FR3-CDR3-FR4 vincolato. Altre molecole ingegnerizzate, come gli anticorpi con dominio specifico, gli anticorpi con dominio singolo, gli anticorpi con dominio eliminato, gli anticorpi chimerici, gli anticorpi con innesto di CDR, i diabody, i triabody, i tetrabody, i minibody, i nanobody (ad esempio, nanobody monovalenti, bivalenti, eccetera), piccoli immunofarmaci modulari (SMIP) e domini IgNAR variabili, sono anch'essi compresi nell'espressione " frammento legante l'antigene", come utilizzato nel presente documento. Un frammento di un anticorpo che lega l'antigene comprenderà in genere almeno un dominio variabile. Il dominio variabile può avere qualsiasi dimensione o composizione aminoacidica e generalmente comprenderà almeno un CDR adiacente o in cornice con una o più sequenze framework. Nei frammenti leganti l'antigene aventi un V_H dominio associato a un dominio V_L , i domini V_H e V_L possono essere situati l'uno rispetto all'altro in qualsiasi disposizione idonea. Ad esempio, la regione variabile può essere dimerica e contenere dimeri V_H-V_H , V_H-V_L o V_L-V_L . In alternativa, il frammento di legame dell'antigene di un anticorpo può contenere un dominio monomero V_H o V_L .

In alcuni aspetti della divulgazione, un frammento di anticorpo che lega l'antigene può contenere almeno un dominio variabile legato covalentemente ad almeno un dominio costante. Le configurazioni non limitanti ed esemplari di domini variabili e costanti che possono essere trovate all'interno di un frammento di legame all'antigene di un anticorpo includono: (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) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; e (xiv) V_L-C_L . In qualsiasi configurazione di domini variabili e costanti, inclusa una qualsiasi delle configurazioni esemplari elencate sopra, i domini variabili e costanti possono essere direttamente collegati tra loro oppure possono essere collegati da una regione cerniera o linker completa o parziale. Una regione cerniera può essere costituita da almeno 2 (*ad esempio*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o più) amminoacidi che danno luogo a un legame flessibile o semi-flessibile tra domini variabili e/o costanti adiacenti in una singola molecola polipeptidica. Inoltre, un frammento di legame all'antigene di un anticorpo può comprendere un omodimero o eterodimero (o altro multimerico) di una qualsiasi delle configurazioni di dominio variabili e costanti

elencate sopra in associazione non covalente tra loro e/o con uno o più domini monomerici V_H o V_L (*ad esempio*, tramite legame disolfuro).

Come per le molecole di anticorpi completi, i frammenti che legano l'antigene possono essere monospecifici o multispecifici (*ad esempio*, bispecifico). Un frammento di antigene multispecifico di un anticorpo comprenderà in genere almeno due diversi domini variabili, in cui ciascun dominio variabile è in grado di legarsi specificamente a un antigene separato o a un epitopo diverso sullo stesso antigene. Qualsiasi formato di anticorpo multispecifico, compresi i formati di anticorpo bispecifici esemplari qui descritti, può essere adattato per l'uso nel contesto di un frammento di anticorpo legante l'antigene utilizzando tecniche di routine disponibili nel settore.

La regione costante di un anticorpo è importante per la capacità dell'anticorpo di fissare il complemento e mediare la citotossicità dipendente dalle cellule. Pertanto, l'isotipo di un anticorpo può essere selezionato in base all'opportunità che l'anticorpo media la citotossicità.

Il termine "anticorpo umano", come usato nella presente, è inteso includere anticorpi aventi regioni variabili e costanti derivate da sequenze di

immunoglobulina di linea germinale umana. Gli anticorpi umani dell'invenzione possono tuttavia includere residui amminoacidici non codificati dalle sequenze germinali di immunoglobuline umane (ad esempio, mutazioni introdotte mediante mutagenesi casuale o sito-specifica *in vitro* o mediante mutazione somatica *in vivo*), ad esempio nelle CDR e in particolare nella CDR3. Tuttavia, l'espressione "anticorpo umano", come usata nella presente, non è destinata a includere anticorpi in cui sequenze CDR derivate dalla linea germinale di un'altra specie di mammifero, per esempio un topo, sono state innestate su sequenze framework umane. Il termine include gli anticorpi prodotti in modo ricombinante in un mammifero non umano o in cellule di un mammifero non umano. Il termine non include gli anticorpi isolati da o generati in un soggetto umano.

L'espressione "anticorpo umano ricombinante", come usata nel presente documento, è intesa a includere tutti gli anticorpi umani preparati, espressi, creati o isolati con mezzi ricombinanti, come gli anticorpi espressi usando un vettore di espressione ricombinante trasfettato in una cellula ospite (descritta più avanti), gli anticorpi isolati da un ricombinante, libreria combinatoria di anticorpi umani (descritta

più sotto), anticorpi isolati da un animale (ad esempio, un topo) che è transgenico per i geni di immunoglobuline umana (vedere ad esempio, Taylor et al. Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticorpi preparati, espressi, creati o isolati con qualsiasi altro mezzo che implichi l'unione di sequenze geniche di immunoglobuline umane ad altre sequenze di DNA. Tali anticorpi umani ricombinanti presentano regioni variabili e costanti derivate da sequenze di immunoglobuline germinali umane. In alcune forme di realizzazione, tuttavia, tali anticorpi umani ricombinanti sono sottoposti a mutagenesi *in vitro* (oppure, quando è usato un animale transgenico per sequenze Ig umane, mutagenesi somatica *in vivo*) e, di conseguenza, le sequenze di amminoacidi delle regioni V_H e V_L degli anticorpi ricombinanti sono sequenze che, sebbene derivate da e correlate a sequenze V_H e V_L germinali umane, possono non esistere in natura all'interno del repertorio germinale anticorpale umano *in vivo*.

Gli anticorpi umani possono esistere in due forme associate all'eterogeneità della cerniera. In una forma, una molecola di immunoglobulina è composta da una struttura stabile a quattro catene di circa 150-160 kDa in cui i dimeri sono tenuti insieme da un

legame disolfuro della catena pesante intercatena. In una seconda forma, i dimeri non sono legati tramite legami disolfuro intercatena e si forma una molecola di circa 75-80 kDa composta da una catena leggera e una pesante accoppiate covalentemente (semi-anticorpo). Queste forme sono state estremamente difficili da separare, anche dopo la purificazione per affinità.

La frequenza della comparsa della seconda forma in vari isotipi di IgG intatti è dovuta, ma non limitata a, differenze strutturali associate all'isotipo della regione cerniera dell'anticorpo. Una singola sostituzione di un aminoacido nella regione cerniera della cerniera IgG4 umana può ridurre significativamente la comparsa della seconda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) ai livelli tipicamente osservati utilizzando una cerniera IgG1 umana. La presente invenzione comprende anticorpi aventi una o più mutazioni nella regione C_H2 o C_H3 della cerniera, le quali possono essere desiderabili, per esempio, nella produzione, per migliorare la resa della forma anticorpale desiderata.

Un "anticorpo isolato", come usato nella presente, indica un anticorpo che è stato identificato e separato e/o recuperato da almeno un componente del suo ambiente

naturale. Ad esempio, un anticorpo che è stato separato o rimosso da almeno un componente di un organismo, o da un tessuto o da una cellula in cui l'anticorpo esiste naturalmente o è prodotto naturalmente, è un "anticorpo isolato" ai fini della presente invenzione. Un anticorpo isolato include anche un anticorpo *in situ* all'interno di una cellula ricombinante. Gli anticorpi isolati sono anticorpi che sono stati sottoposti ad almeno una fase di purificazione o isolamento. Secondo alcune forme di realizzazione, un anticorpo isolato può essere sostanzialmente privo di altro materiale cellulare e/o sostanze chimiche.

L'espressione "si lega in modo specifico" o simili significa che un anticorpo o un suo frammento legante l'antigene forma un complesso con un antigene relativamente stabile in condizioni fisiologiche. I metodi per determinare se un anticorpo si lega specificamente a un antigene sono ben noti nella tecnica e comprendono, ad esempio, la dialisi all'equilibrio, la risonanza plasmonica di superficie e simili. Ad esempio, un anticorpo che "lega specificamente" ANGPTL3 comprende anticorpi che legano ANGPTL3 o una sua porzione con una K_D inferiore a circa 1000 nM, inferiore a circa 500 nM, inferiore a circa 300 nM, inferiore a circa 200 nM, inferiore a circa

100 nM, inferiore a circa 90 nM, inferiore a circa 80 nM, inferiore a circa 70 nM, inferiore a circa 60 nM, inferiore a circa 50 nM, inferiore a circa 40 nM, inferiore a circa 30 nM, inferiore a circa 20 nM, inferiore a circa 10 nM, inferiore a circa 5 nM, inferiore a circa 4 nM, inferiore a circa 3 nM, inferiore a circa 2 nM, inferiore a circa 1 nM o inferiore a circa 0,5 nM, come misurato in un saggio di risonanza plasmonica di superficie. Un anticorpo isolato che lega specificamente ANGPTL3 umano può tuttavia avere una reattività incrociata con altri antigeni, come le molecole ANGPTL3 di altre specie (non umane).

Gli anticorpi anti-ANGPTL3 utili per i metodi della presente divulgazione possono comprendere una o più sostituzioni aminoacidiche, inserzioni e/o delezioni nelle regioni di struttura e/o CDR dei domini variabili della catena pesante e leggera rispetto alle corrispondenti sequenze germinali da cui gli anticorpi sono stati derivati. Tali mutazioni possono essere prontamente accertate confrontando le sequenze di amminoacidi divulgate nella presente con le sequenze germinali disponibili, per esempio, da database pubblici di sequenze anticorpali. La presente divulgazione include anticorpi, e loro segmenti

leganti l'antigene, che sono derivati da una qualsiasi delle sequenze di amminoacidi divulgate nella presente, in cui uno o più amminoacidi all'interno di una o più regioni cornice e/o CDR sono mutati nel/i residuo/i corrispondente/i della sequenza germinale da cui è stato derivato l'anticorpo, o nel/i residuo/i corrispondente/i di un'altra sequenza germinale umana, o in una sostituzione amminoacidica conservativa del/i residuo/i germinale/i corrispondente/i (tali variazioni di sequenza sono indicate collettivamente nella presente come "mutazioni germinali"). Un comune esperto della tecnica, iniziando con le sequenze di regione variabile di catena pesante e leggera divulgate nella presente, può facilmente produrre numerosi anticorpi e frammenti leganti l'antigene che comprendono una o più mutazioni germinali singole o loro combinazioni. In alcuni aspetti, tutti i residui di framework e/o CDR all'interno dei domini V_H e/o V_L sono retromutati nei residui presenti nella sequenza germinale originale da cui è stato derivato l'anticorpo. In altri aspetti, soltanto alcuni residui sono retromutati nella sequenza germinale originaria, *per esempio*, soltanto i residui mutati presenti all'interno dei primi 8 amminoacidi di FR1 o all'interno degli ultimi 8 amminoacidi di FR4, oppure

soltanto i residui mutati presenti all'interno di CDR1, CDR2 o CDR3. In altri aspetti, uno o più dei residui di framework e/o CDR sono mutati nel/i residuo/i corrispondente/i di una sequenza germinale differente (ovvero, una sequenza germinale che è differente dalla sequenza germinale da cui è stato derivato originariamente l'anticorpo). Inoltre, gli anticorpi della presente divulgazione possono contenere una qualsiasi combinazione di due o più mutazioni germinali all'interno delle regioni framework e/o CDR, *per esempio*, in cui determinati residui singoli sono mutati nel residuo corrispondente di una particolare sequenza germinale mentre alcuni altri residui che differiscono dalla sequenza germinale originale sono mantenuti o sono mutati nel residuo corrispondente di una sequenza germinale differente. Una volta ottenuti, anticorpi e frammenti leganti l'antigene che contengono una o più mutazioni germinali possono essere facilmente testati per una o più proprietà desiderate come specificità di legame migliorata, affinità di legame migliorata, proprietà biologiche antagoniste o agoniste migliorate o potenziate (a seconda dei casi), immunogenicità ridotta, eccetera. Gli anticorpi e frammenti leganti l'antigene ottenuti in questo modo generale sono

compresi entro la presente divulgazione.

La presente divulgazione comprende anche metodi che prevedono l'uso di anticorpi anti-ANGPTL3 comprendenti varianti di una qualsiasi delle sequenze aminoacidiche HCVR, LCVR e/o CDR qui descritte con una o più sostituzioni conservative. Ad esempio, la presente divulgazione prevede l'uso di anticorpi anti-ANGPTL3 aventi sequenze aminoacidiche HCVR, LCVR e/o CDR con, *ad esempio*, 10 o meno, 8 o meno, 6 o meno, 4 o meno, eccetera sostituzioni aminoacidiche conservative rispetto a qualsiasi sequenza aminoacidica HCVR, LCVR e/o CDR qui descritta.

Il termine "risonanza plasmonica di superficie", come qui utilizzato, si riferisce a un fenomeno ottico che consente l'analisi delle interazioni in tempo reale mediante il rilevamento delle alterazioni delle concentrazioni proteiche all'interno di una matrice biosensoriale, ad esempio utilizzando il sistema BIAcore™ (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Il termine " K_D ", come qui utilizzato, si riferisce alla costante di dissociazione di equilibrio di una particolare interazione anticorpo-antigene.

Il termine "epitopo" si riferisce a un determinante antigenico che interagisce con uno specifico sito di

legame dell'antigene nella regione variabile di una molecola di anticorpo nota come paratopo. Un singolo antigene può avere più di un epitopo. Pertanto, anticorpi diversi possono legarsi a diverse aree di un antigene e avere effetti biologici diversi. Gli epitopi possono essere conformazionali o lineari. Un epitopo conformazionale è prodotto da amminoacidi spazialmente giustapposti provenienti da diversi segmenti della catena polipeptidica lineare. Un epitopo lineare è quello prodotto da residui amminoacidici adiacenti in una catena polipeptidica. In determinate circostanze, un epitopo può comprendere gruppi di saccaridi, gruppi fosforici o gruppi sulfonici sull'antigene.

Secondo alcuni aspetti, gli anticorpi anti-ANGPTL3 utilizzati nei metodi della presente divulgazione sono anticorpi con caratteristiche di legame dipendenti dal pH. Come usato nel presente documento, l'espressione "legame dipendente dal pH" significa che l'anticorpo o il suo frammento legante l'antigene mostra un "legame ridotto con l'ANGPTL3 a pH acido rispetto a pH neutro" (ai fini della presente divulgazione, entrambe le espressioni possono essere usate in modo intercambiabile). Per esempio, gli anticorpi "con caratteristiche di legame dipendenti dal pH"

comprendono anticorpi e loro frammenti leganti l'antigene che si legano all'ANGPTL3 con maggiore affinità a pH neutro che a pH acido. In alcuni aspetti, gli anticorpi e i frammenti leganti l'antigene della presente divulgazione legano l'ANGPTL3 con un'affinità almeno 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o più volte superiore a pH neutro rispetto a pH acido.

Secondo questo aspetto della divulgazione, gli anticorpi anti-ANGPTL3 con caratteristiche di legame dipendenti dal pH possono possedere una o più variazioni aminoacidiche rispetto all'anticorpo anti-ANGPTL3 parentale. Ad esempio, un anticorpo anti-ANGPTL3 con caratteristiche di legame dipendenti dal pH può contenere una o più sostituzioni o inserzioni di istidina, *ad esempio* in una o più CDR di un anticorpo anti-ANGPTL3 parentale. Pertanto, secondo alcuni aspetti della divulgazione, vengono forniti metodi che comprendono la somministrazione di un anticorpo anti-ANGPTL3 che comprende sequenze aminoacidiche CDR (*ad esempio*, CDR della catena pesante e leggera) identiche alle sequenze aminoacidiche CDR di un anticorpo ANGPTL3 parentale, tranne per la sostituzione di uno o più aminoacidi di una o più CDR dell'anticorpo parentale con un residuo

di istidina. Gli anticorpi anti-ANGPTL3 con legame dipendente dal pH possono possedere, *ad esempio*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o più sostituzioni di istidina, sia all'interno di un singolo CDR di un anticorpo parentale o distribuite in più (*ad esempio*, 2, 3, 4, 5, o 6) CDR di un anticorpo anti-ANGPTL3 parentale. Ad esempio, la presente divulgazione prevede l'uso di anticorpi anti-ANGPTL3 con legame dipendente dal pH che comprendono una o più sostituzioni istidiniche in HCDR1, una o più sostituzioni istidiniche in HCDR2, una o più sostituzioni istidiniche in HCDR3, una o più sostituzioni istidiniche in LCDR1, una o più sostituzioni istidiniche in LCDR2, e/o una o più sostituzioni istidiniche in LCDR3, di un anticorpo parentale anti-ANGPTL3.

Come usata qui, l'espressione "pH acido" indica un pH pari o inferiore a 6,0 (*ad esempio*, inferiore a circa 6,0, inferiore a circa 5,5, inferiore a circa 5,0, eccetera). L'espressione "pH acido" include valori di pH di circa 6,0, 5,95, 5,90, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 o meno. Per "pH neutro" si intende un pH compreso tra 7,0 e 7,4 circa. L'espressione "pH neutro" include valori di pH pari a circa 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 e 7,4.

Nella presente invenzione, l'inibitore di ANGPTL3 è evinacumab.

Preparazione di Anticorpi Umani

Gli anticorpi anti-ANGPTL3 possono essere prodotti secondo qualsiasi metodo di produzione/isolamento di anticorpi noto nella tecnica. Ad esempio, gli anticorpi da utilizzare nei metodi della presente divulgazione possono essere realizzati con tecnologie di ibridoma, phage display, yeast display, ecc. Gli anticorpi da utilizzare nei metodi della presente divulgazione possono essere, *ad esempio*, anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati o anticorpi completamente umani.

I metodi per generare anticorpi umani in topi transgenici sono ben noti nella tecnica. Un qualsiasi tale metodo noto può essere usato nel contesto della presente divulgazione per realizzare anticorpi umani che si legano in modo specifico a ANGPTL3.

Ad esempio, utilizzando la tecnologia VELOCIMMUNE™ (si veda, ad esempio, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals) o qualsiasi altro metodo noto per la generazione di anticorpi monoclonali, vengono inizialmente isolati anticorpi chimerici ad alta affinità contro l'ANGPTL3 con una regione variabile umana e una regione costante di topo. La tecnologia

VELOCIMMUNE® prevede la generazione di un topo transgenico con un genoma comprendente regioni variabili di catene pesanti e leggere umane operativamente collegate a loci endogeni di regioni costanti di topo, in modo che il topo produca un anticorpo comprendente una regione variabile umana e una regione costante di topo in risposta a una stimolazione antigenica. Il DNA che codifica le regioni variabili delle catene pesanti e leggere dell'anticorpo viene isolato e collegato operativamente al DNA che codifica le regioni costanti delle catene pesanti e leggere umane. Il DNA viene quindi espresso in una cellula in grado di esprimere l'anticorpo completamente umano.

In genere, un topo VELOCIMMUNE® viene messo alla prova con l'antigene di interesse e vengono recuperate cellule linfatiche (come le cellule B) che esprimono anticorpi. Le cellule linfatiche possono essere fuse con una linea cellulare di mieloma per preparare linee cellulari immortali di ibridoma; tali linee cellulari di ibridoma vengono esaminate e selezionate per identificare linee cellulari di ibridoma che producono anticorpi specifici per l'antigene di interesse. Il DNA che codifica le regioni variabili della catena pesante e della catena leggera può essere isolato e

collegato alle regioni costanti isotipiche desiderabili della catena pesante e della catena leggera. Tale proteina anticorpale può essere prodotta in una cellula, ad esempio una cellula CHO. Il DNA codificante gli anticorpi chimerici antigene-specifici o i domini variabili delle catene leggere e pesanti può essere isolato direttamente da linfociti antigene-specifici.

Inizialmente, vengono isolati anticorpi chimerici ad alta affinità con una regione variabile umana e una regione costante di topo. Gli anticorpi sono caratterizzati e selezionati per le caratteristiche desiderate, inclusa affinità, selettività, epitopi, eccetera, usando procedure standard note agli esperti nella tecnica. Le regioni costanti di topo vengono sostituite con una regione costante umana desiderata per generare l'anticorpo completamente umano dell'invenzione, ad esempio IgG1 o IgG4 di tipo selvatico o modificato. Sebbene la regione costante selezionata possa variare secondo l'uso specifico, le caratteristiche di legame all'antigene ad alta affinità e di specificità per il bersaglio risiedono nella regione variabile.

In generale, gli anticorpi che possono essere utilizzati nei metodi della presente divulgazione

possiedono un'elevata affinità, come descritto in precedenza, se misurata attraverso il legame con l'antigene immobilizzato su fase solida o in fase di soluzione. Le regioni costanti del topo vengono sostituite con regioni costanti umane desiderate per generare gli anticorpi completamente umani della divulgazione. Sebbene la regione costante selezionata possa variare secondo l'uso specifico, le caratteristiche di legame all'antigene ad alta affinità e di specificità per il bersaglio risiedono nella regione variabile.

Esempi specifici di anticorpi umani o di frammenti di anticorpi che legano l'antigene in modo specifico all'ANGPTL3, che possono essere utilizzati nel contesto dei metodi della presente divulgazione, includono anticorpi o proteine che legano l'antigene che comprendono le sei CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3) della regione variabile della catena pesante e leggera (HCVR/LCVR), una coppia di sequenze aminoacidiche che comprende i SEQ ID NO: 1/5.

In alcuni aspetti della divulgazione, l'anticorpo anti-ANGPTL3, o un suo frammento legante l'antigene, che può essere utilizzato nei metodi comprende regioni determinanti la complementarità della catena pesante e leggera (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3)

comprendenti le sequenze aminoacidiche di SEQ ID NO:2, 3, 4, 6, 7 e 8.

In alcuni aspetti della divulgazione, l'anticorpo anti-ANGPTL3, o un suo frammento legante l'antigene, che può essere utilizzato nei metodi comprende un HCVR avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:1 e un LCVR avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:5.

Composizioni farmaceutiche e metodi di somministrazione

La presente invenzione prevede la somministrazione di un inibitore di ANGPTL3 a un paziente in combinazione con una statina, un inibitore dell'assorbimento del colesterolo e un inibitore della proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi, dove l'inibitore di ANGPTL3 e gli agenti aggiuntivi sono contenuti nella stessa composizione farmaceutica o in composizioni diverse. Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione sono formulate con veicolanti, eccipienti e altri agenti idonei che forniscono trasferimento, somministrazione, tolleranza migliorati e simili. Nel formulario noto a tutti i chimici farmaceutici si possono trovare molteplici formulazioni appropriate: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Queste formulazioni includono, ad esempio, polveri, paste, unguenti, gelatine, cere,

oli, lipidi, vescicole contenenti lipidi (cationici o anionici) (come LIPOFECTIN™), coniugati di DNA, paste assorbenti anidre, emulsioni olio-in-acqua e acqua-in-olio, emulsioni carbowax (polietilenglicoli di vari pesi molecolari), gel semisolidi e miscele semisolide contenenti carbowax. Si veda anche Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Formulazioni farmaceutiche esemplari comprendenti anticorpi anti-ANGPTL3 che possono essere utilizzate nel contesto della presente invenzione includono una qualsiasi delle formulazioni indicate in US 8,795,669 (che descrive, *inter alia*, formulazioni esemplificative comprendenti alirocumab), o in WO2013/166448, o WO2012/168491.

Vari sistemi di somministrazione sono noti e possono essere usati per somministrare la composizione farmaceutica dell'invenzione, *per esempio*, incapsulamento in liposomi, microparticelle, microcapsule, cellule ricombinanti in grado di esprimere i virus mutanti, endocitosi mediata dal recettore (si veda, per esempio, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). I metodi di somministrazione comprendono, a titolo esemplificativo, le vie intradermica, intramuscolare,

intraperitoneale, endovenosa, sottocutanea, intranasale, epidurale e orale. La composizione può essere somministrata attraverso qualsiasi via conveniente, ad esempio mediante infusione o iniezione in bolo, mediante assorbimento attraverso i rivestimenti epiteliali o mucocutanei (ad esempio mucosa orale, mucosa rettale e intestinale, ecc.) e può essere somministrata insieme ad altri agenti biologicamente attivi.

Una composizione farmaceutica della presente invenzione può essere somministrata per via sottocutanea o endovenosa con un ago e una siringa standard. Inoltre, per quanto riguarda la somministrazione sottocutanea, un dispositivo di somministrazione a penna trova facilmente applicazione nella somministrazione di una composizione farmaceutica della presente invenzione. Tale dispositivo di somministrazione può essere riutilizzabile o monouso. Un dispositivo di somministrazione a penna riutilizzabile utilizza generalmente una cartuccia sostituibile che contiene una composizione farmaceutica. Una volta che tutta la composizione farmaceutica contenuta nella cartuccia è stata somministrata e la cartuccia è vuota, la cartuccia vuota può essere prontamente gettata e

sostituita con una nuova cartuccia contenente la composizione farmaceutica. Il dispositivo di somministrazione della penna può quindi essere riutilizzato. In un dispositivo di somministrazione con penna monouso, non c'è una cartuccia sostituibile. Piuttosto, il dispositivo di somministrazione monouso viene fornito pre-riempito con la composizione farmaceutica contenuta in un serbatoio all'interno del dispositivo. Una volta svuotato il serbatoio dalla composizione farmaceutica, l'intero dispositivo viene gettato.

Numerosi dispositivi di somministrazione a penna e di autoiniezione riutilizzabili trovano applicazione nella somministrazione sottocutanea di una composizione farmaceutica della presente invenzione. Gli esempi includono, ma non sono limitati a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Regno Unito), DISETRONIC™ penna (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Svizzera), HUMALOG MIX 75/25™ penna, HUMALOG™ penna, HUMALIN 70/30™ penna (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenaghen, Danimarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenaghen, Danimarca), BD™ penna (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, STARLET OTTIMALE™, e OTTICO™ (sanofi-aventis,

Francoforte, Germania), per citarne solo alcuni. Esempi di dispositivi di somministrazione a penna monouso aventi applicazioni nella somministrazione sottocutanea di una composizione farmaceutica della presente invenzione includono, in via non limitativa, la penna SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) e la KWIKPEN™ (Eli Lilly), l'autoiniettore SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), la PENLET™ (Haselmeier, Stoccarda, Germania), la EPIPEN (Dey, L.P.) e la penna HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), solo per nominarne alcuni. In determinate situazioni, la composizione farmaceutica può essere somministrata in un sistema a rilascio controllato. In determinate situazioni, la composizione farmaceutica può essere fornita tramite un sistema a rilascio controllato. In una forma di realizzazione, può essere utilizzata una pompa (vedere Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). In un'altra forma di realizzazione, possono essere utilizzati materiali polimerici; vedere, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. In ancora un'altra forma di realizzazione, un sistema di rilascio controllato può essere posizionato in prossimità del target della composizione, richiedendo

così solo una frazione della dose sistemica (si veda, *ad esempio*, Goodson, 1984, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138). Altri sistemi di rilascio controllato sono discussi nella revisione di Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

Le preparazioni iniettabili possono includere forme di dosaggio per iniezioni endovenose, sottocutanee, intracutanee e intramuscolari, infusioni a goccia, ecc. Queste preparazioni iniettabili possono essere preparate con metodi noti. Ad esempio, i preparati iniettabili possono essere preparati, *ad esempio*, sciogliendo, sospendendo o emulsionando l'anticorpo o il suo sale sopra descritto in un mezzo acquoso sterile o in un mezzo oleoso convenzionalmente utilizzato per le iniezioni. Come mezzo acquoso per le iniezioni, vi sono, per esempio, salina fisiologica, una soluzione isotonica contenente glucosio e altri agenti ausiliari, eccetera, le quali possono essere usate in combinazione con un agente di solubilizzazione appropriato come un alcol (per esempio, etanolo), un polialcol (per esempio, propilenglicole, polietilenglicole), un tensioattivo non ionico [per esempio, polisorbato 80, HCO-50 (polioossietilene (50 moli) addotto di olio di ricino idrogenato)], eccetera. Come mezzo oleoso, sono impiegati, per

esempio, olio di sesamo, olio di semi di soia, eccetera, che possono essere usati in combinazione con un agente solubilizzante come benzoato di benzile, alcol benzilico, eccetera. L'iniezione così preparata è preferibilmente contenuta in un'ampolla appropriata. Vantaggiosamente, le composizioni farmaceutiche per uso orale o parenterale sopra descritte sono preparate in forme di dosaggio in una dose unitaria adatta alla dose dei principi attivi. Tali forme di dosaggio in dose unitaria comprendono, ad esempio, compresse, pillole, capsule, iniezioni (fiale), supposte, ecc.

Dosaggio

La quantità di un inibitore di ANGPTL3 somministrata a un soggetto secondo i metodi della presente invenzione è, in genere, una quantità terapeuticamente efficace. Come usato nel presente documento, l'espressione "quantità terapeuticamente efficace di un inibitore di ANGPTL3" indica una dose di un inibitore di ANGPTL3 che, se somministrata in combinazione con una statina, ezetimibe e lomitapide, determina una riduzione rilevabile (almeno del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, o più rispetto al basale) di uno o più parametri selezionati dal gruppo costituito da colesterolo totale, LDL-C, ApoB, ApoA-1, Apo CIII,

non-HDL-C, VLDL-C, trigliceridi e Lp(a), o di una quantità tale da ridurre o eliminare la necessità di altri agenti terapeutici o interventi da parte del paziente, come, ad esempio, l'aferesi delle lipoproteine.

La quantità di inibitore di ANGPTL3 somministrata a un soggetto secondo la presente invenzione è, in genere, una quantità terapeuticamente efficace. Come usato nel presente documento, l'espressione "quantità terapeuticamente efficace di un inibitore di ANGPTL3" indica una dose di inibitore di ANGPTL3 che, se combinata con gli agenti terapeutici qui descritti, determina una riduzione rilevabile (almeno del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o più rispetto al basale) di uno o più parametri selezionati dal gruppo costituito da colesterolo totale, LDL-C, ApoB, ApoA-1, Apo CIII, non-HDL-C, VLDL-C, trigliceridi e Lp(a).

Nel caso di un anticorpo anti-ANGPTL3, una quantità terapeuticamente efficace può andare da circa 0,05 mg a circa 600 mg, ad esempio circa 0,05 mg, circa 0,1 mg, circa 1,0 mg, circa 1.5 mg, circa 2,0 mg, circa 10 mg, circa 20 mg, circa 30 mg, circa 40 mg, circa 50 mg, circa 60 mg, circa 70 mg, circa 80 mg, circa 90 mg, circa 100 mg, circa 110 mg, circa 120 mg, circa

130 mg, circa 140 mg, circa 160 mg, circa 170 mg, circa 180 mg, circa 190 mg, circa 200 mg, circa 210 mg, circa 220 mg, circa 230 mg, circa 240 mg, circa 250 mg, circa 260 mg, circa 270 mg, circa 280 mg, circa 290 mg, circa 300 mg, circa 310 mg, circa 320 mg, circa 330 mg, circa 340 mg, circa 350 mg, circa 360 mg, circa 370 mg, circa 380 mg, circa 390 mg, circa 400 mg, circa 410 mg, circa 420 mg, circa 430 mg, circa 440 mg, circa 450 mg, circa 460 mg, circa 470 mg, circa 480 mg, circa 490 mg, circa 500 mg, circa 510 mg, circa 520 mg, circa 530 mg, circa 540 mg, circa 550 mg, circa 560 mg, circa 570 mg, circa 580 mg, circa 590 mg, o circa 600 mg, dell'anticorpo anti-ANGPTL3.

La quantità di anticorpo anti-ANGPTL3 contenuta nelle singole dosi può essere espressa in termini di milligrammi di anticorpo per chilogrammo di peso corporeo del paziente (ovvero, mg/kg). Ad esempio, l'anticorpo anti-ANGPTL3 può essere somministrato a un paziente a una dose compresa tra circa 0,0001 e circa 20 mg/kg del peso corporeo del paziente.

Terapie di combinazione

La presente invenzione può anche comprendere la somministrazione di un inibitore di ANGPTL3 in combinazione con una statina, ezetimibe e lomitapide a un paziente non responsivo, non è adeguatamente

controllato o è intollerante ad altre terapie standard di riduzione dei lipidi. In alcune forme di realizzazione, la necessità di somministrare ulteriormente la terapia standard per la riduzione dei lipidi può essere eliminata del tutto. In alcune forme di realizzazione, l'uso combinato dell'inibitore di ANGPTL3 con gli altri agenti qui descritti può essere utilizzato in combinazione ("in aggiunta") alla terapia di riduzione dei lipidi precedentemente prescritta al paziente. Ad esempio, nel contesto della riduzione di almeno un parametro lipidico/lipoproteico in un paziente affetto da iperlipidemia (*ad esempio* ipercolesterolemia), in cui il paziente non risponde, non è adeguatamente controllato o è intollerante a una terapia standard di riduzione dei lipidi, una combinazione di un inibitore di ANGPTL3 con ezetimibe e lomitapide può essere somministrata a un paziente in combinazione con un regime terapeutico giornaliero stabile di statine. Esempi di regimi terapeutici giornalieri a base di statine che possono essere utilizzati nel contesto della presente invenzione includono *ad esempio*: atorvastatina (10, 20, 40 o 80 mg al giorno), (atorvastatina/ezetimibe 10/10 o 40/10 mg al giorno), rosuvastatina (5, 10 o 20 mg al giorno), cerivastatina (0,4 o 0,8 mg al giorno), pitavastatina

(1, 2 o 4 mg al giorno), fluvastatina (20, 40 o 80 mg al giorno), simvastatina (5, 10, 20, 40 o 80 mg al giorno), simvastatina/ezetimibe (10/10, 20/10, 40/10 o 80/10 mg al giorno), lovastatina (10, 20, 40 o 80 mg al giorno), pravastatina (10, 20, 40 o 80 mg al giorno) e loro combinazioni. Altre terapie modificanti i lipidi con cui un inibitore di ANGPTL3 può essere somministrato in combinazione nel contesto della presente invenzione includono, *ad esempio*, (1) un agente che aumenta il catabolismo delle lipoproteine (come la niacina); e/o (2) attivatori del fattore di trascrizione LXR che svolge un ruolo nell'eliminazione del colesterolo, come il 22-idrossicolesterolo.

Regimi di Somministrazione

Secondo alcune forme di realizzazione della presente invenzione, dosi multiple di un inibitore di ANGPTL3 (ovvero, una composizione farmaceutica comprendente un inibitore di ANGPTL3) possono essere somministrate a un soggetto per un periodo di tempo definito (*ad esempio*, in aggiunta a un regime terapeutico giornaliero di statine o a un'altra terapia di fondo che modifica i lipidi), oltre alla somministrazione di ezetimibe e lomitapide. I metodi secondo questo aspetto dell'invenzione comprendono la somministrazione sequenziale a un soggetto di dosi

multiple di un inibitore di ANGPTL3. Come usato nel presente documento, per "somministrazione sequenziale" si intende che ogni dose dell'anticorpo viene somministrata al soggetto in un momento diverso, ad esempio in giorni diversi separati da un intervallo predeterminato (ad esempio, ore, giorni, settimane o mesi). La presente invenzione prevede la somministrazione sequenziale al paziente di una singola dose iniziale di un inibitore dell'ANGPTL3, seguita da una o più dosi secondarie dell'inibitore dell'ANGPTL3 e, facoltativamente, da una o più dosi terziarie dell'inibitore dell'ANGPTL3.

I termini "dose iniziale", "dosi secondarie" e "dosi terziarie" si riferiscono alla sequenza temporale di somministrazione delle singole dosi di una composizione farmaceutica contenente un inibitore dell'ANGPTL3. Pertanto, la "dose iniziale" è la dose che viene somministrata all'inizio del regime di trattamento (detta anche "dose di base"); le "dosi secondarie" sono le dosi che vengono somministrate dopo la dose iniziale; e le "dosi terziarie" sono le dosi che vengono somministrate dopo le dosi secondarie. Le dosi iniziale, secondarie e terziarie possono tutte contenere la stessa quantità di anticorpo anti-ANGPTL3 ma, generalmente, possono

differire tra loro in termini di frequenza di somministrazione. In alcuni casi, tuttavia, le quantità di molecola legante antigene contenuto nelle dosi iniziale, secondarie e/o terziarie variano tra loro (*per esempio*, regolate in aumento o riduzione a seconda delle esigenze) durante il corso di trattamento. In alcune forme di realizzazione, due o più (*per esempio*, 2, 3, 4 o 5) dosi sono somministrate all'inizio del regime di trattamento come "dosi di caricamento" seguite da dosi successive che sono somministrate su base meno frequente (*per esempio*, "dosi di mantenimento").

In alcune forme di realizzazione esemplificative, ciascuna dose secondaria e/o terziaria è somministrata da 1 a 26 (*per esempio*, 1, 1½, 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 o più) settimane dopo la dose immediatamente precedente. L'espressione "la dose immediatamente precedente", come usata nella presente, indica, in una sequenza di molteplici somministrazioni, la dose di molecola legante antigene che è somministrata a un paziente prima della somministrazione della dose appena successiva nella

sequenza senza alcuna dose intermedia.

I metodi secondo questo aspetto dell'invenzione possono comprendere somministrare a un paziente un qualsiasi numero di dosi secondarie e/o terziarie di un inibitore di ANGPTL3. Ad esempio, in alcune forme di realizzazione viene somministrata al paziente una sola dose secondaria. In altre forme di realizzazione, due o più (*ad esempio, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o più*) dosi secondarie sono somministrate al paziente. Allo stesso modo, in alcune forme di realizzazione viene somministrata al paziente una sola dose terziaria. In altre forme di realizzazione, due o più (*ad esempio, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o più*) dosi terziarie sono somministrate al paziente.

Nelle forme di realizzazione che prevedono più dosi secondarie, ogni dose secondaria può essere somministrata con la stessa frequenza delle altre dosi secondarie. Ad esempio, ogni dose secondaria può essere somministrata al paziente da 1 a 2, 4, 6, 8 o più settimane dopo la dose immediatamente precedente. Analogamente, nelle forme di realizzazione che prevedono più dosi terziarie, ogni dose terziaria può essere somministrata con la stessa frequenza delle altre dosi terziarie. Ad esempio, ogni dose terziaria può essere somministrata al paziente da 1 a 2, 4, 6,

8 o più settimane dopo la dose immediatamente precedente. In alternativa, la frequenza con cui le dosi secondaria e/o terziaria vengono somministrate a un paziente può variare nel corso del regime di trattamento. La frequenza di somministrazione può essere regolata anche da un medico durante il trattamento in base alle esigenze del singolo paziente dopo l'esame clinico. Allo stesso modo, le dosi delle terapie concomitanti, ad esempio la statina, l'ezetimibe e la lomitapide, possono essere modificate dal medico nel corso del trattamento in base alla normalizzazione dei livelli lipidici osservata durante il trattamento.

ESEMPI

Gli esempi che seguono sono presentati in modo da fornire a coloro che hanno un'abilità ordinaria nella tecnica una divulgazione e una descrizione completa di come realizzare e utilizzare i metodi e le composizioni dell'invenzione e non intendono limitare l'ambito di ciò che gli inventori considerano la loro invenzione. Sono stati compiuti sforzi per garantire la precisione rispetto ai numeri usati (ad esempio, quantità, temperatura, eccetera), ma occorre tenere conto di alcuni errori sperimentali e deviazioni. Se non diversamente indicato, le parti sono parti in base al

peso, il peso molecolare è il peso molecolare medio, la temperatura è in gradi centigradi, e la pressione è pari o vicina all'atmosfera.

Esempio 1. Generazione di Anticorpi Hmani contro ANGPTL3 umana

L'anticorpo ANGPTL3 esemplificativo utilizzato nel seguente esempio è l'anticorpo umano anti-ANGPTL3 noto come "evinacumab". Evinacumab presenta le seguenti caratteristiche di sequenza aminoacidica: una regione variabile della catena pesante (HCVR) che comprende SEQ ID NO:1 e un dominio variabile della catena leggera (LCVR) che comprende SEQ ID NO:5; una regione determinante la complementarità della catena pesante 1 (HCDR1) che comprende SEQ ID NO:2, un HCDR2 comprendente SEQ ID NO:3, un HCDR3 comprendente SEQ ID NO:4, una regione determinante la complementarità della catena leggera 1 (LCDR1) comprendente SEQ ID NO:6, un LCDR2 comprendente SEQ ID NO:7 e un LCDR3 comprendente SEQ ID NO:8.

Esempio 2: Sicurezza ed efficacia di Evinacumab, un anticorpo monoclonale contro ANGPTL3, in pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote che ricevono terapie lipidiche concomitanti

L'ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH) comporta profonde carenze genetiche nella via del

recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL), che portano a un aumento catastrofico del colesterolo LDL (LDL-C) e a una grave aterosclerosi precoce; la risposta alle statine e agli anticorpi PCSK9 è limitata. Studi preclinici e analisi genetiche sull'uomo suggeriscono che l'inibizione della proteina angiopoietina-simile (ANGPTL3) abbassa la LDL-C e apporta benefici cardiovascolari, indipendentemente dal recettore LDL. Evinacumab, un anticorpo ANGPTL3 umano, è stato somministrato a nove adulti HoFH (tre omozigoti nulli) già sottoposti a terapie convenzionali massimamente tollerate. L'LDL-C è diminuito del 49% (intervallo da -25% a -90%) alla settimana 4 (endpoint primario). La riduzione media complessiva del picco di LDL-C è stata di $-58 \pm 18\%$ (da -90% a -33%) tra le settimane 4 e 12, dimostrando che l'inibizione dell'ANGPTL3 con evinacumab riduce sostanzialmente l'LDL-C nei pazienti con HoFH.

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) svolgono un ruolo importante nell'avvio e nella progressione dell'aterosclerosi e del rischio di malattie cardiovascolari. L'ipercolesterolemia familiare (FH) è tipicamente un disturbo che si manifesta attraverso mutazioni nei geni che codificano le proteine che regolano la clearance delle LDL. Questi includono i

geni per il recettore delle lipoproteine a bassa densità (*LDLR*), l'apolipoproteina B (*APOB*), la proproteina convertasi subtilisina/kexina di tipo 9 (*PCSK9*), e la proteina adattatrice 1 del recettore delle lipoproteine a bassa densità (*LDLRAP1*) (Cuchel, et al. 2014 *Eur Heart J* 35:2146-57). I pazienti con FH eterozigote hanno di solito livelli plasmatici di colesterolo LDL (LDL-C) non trattati che vanno da 350 a 550 mg per decilitro e generalmente rispondono alle terapie di riduzione dei lipidi, comprese dosi moderate o elevate di statine ad alta potenza, ezetimibe e anticorpi PCSK9 (Goldberg, et al. 2011 *J Clin Lipidol* 2011;5:S1-8; Kastelein, et al. 2014 *Cardiovasc Drugs Ther* 28:281-9). La FH omozigote (HoFH) è una malattia rara, che colpisce una persona su 160.000-300.000. I pazienti con HoFH sono portatori di due mutazioni che causano la FH (omozigoti o eterozigoti composti), hanno livelli di LDL-C non trattati molto più elevati, che generalmente vanno da 500 a 1000 mg per decilitro (Kolansky, et al. 2008 *The American journal of cardiology* 102:1438-43), e sono significativamente meno responsivi o non responsivi alle terapie standard di riduzione dei lipidi. La maggior parte degli individui con HoFH sviluppa una grave xantomatosi, una malattia coronarica e

un'aterosclerosi periferica in età precoce e può morire prima dei 30 anni se non viene trattata (Nordestgaard, et al. 2013 *Eur Heart J* 34:3478-90a).

L'eterogeneità genetica e fenotipica dell'HoFH può tradursi in un'ampia variabilità nella manifestazione della malattia cardiovascolare e nella risposta alle terapie per la riduzione dei lipidi. Alcune mutazioni che causano la FH determinano recettori LDL difettosi con attività residua, mentre altre non hanno alcuna attività e quindi non rispondono ai farmaci convenzionali per la riduzione dei lipidi, come le statine e gli anticorpi PCSK9, che mirano principalmente al processo di espressione dei recettori LDL (Santos PC, Pereira AC. 2015 *Pharmacogenomics* 16:1743-50; Rader DJ, Kastelein JJ. 2014 *Circulation* 129:1022-32). Recentemente sono stati approvati farmaci con meccanismi d'azione non correlati al recettore LDL, come la lomitapide e il mipomersen, per il trattamento dell'HoFH, ma il loro uso può essere ostacolato da problemi di tollerabilità e sicurezza.

La proteina 3 simile all'angiopoietina (ANGPTL3) è una proteina secreta espressa nel fegato. Agisce per aumentare i livelli plasmatici di trigliceridi, LDL-C e colesterolo delle lipoproteine ad alta densità (HDL-

C) inibendo l'attività della lipoproteina lipasi e della lipasi endoteliale o modulando la clearance delle lipoproteine ricche di trigliceridi a monte della produzione di LDL (Wang, et al. 2015 *J Lipid Res* 56:1296-307; Musunuru, et al. 2010 *N Engl J Med* 363:2220-7). Studi preclinici dimostrano che il knockout dell'ANGPTL3, o il suo blocco mediante un anticorpo, può abbassare i trigliceridi e l'LDL-C indipendentemente dall'LDL-R e avere effetti benefici in modelli di aterosclerosi (Ando, et al. 2003 *J Lipid Res* 44:1216-23; Dewey, et al. 2017 *New Engl J Med*; in stampa). Coerentemente, studi genetici su larga scala nell'uomo dimostrano che mutazioni con perdita di funzione in *ANGPTL3* portano a una riduzione dei livelli plasmatici di trigliceridi, LDL-C e HDL-C (Robciuc, et al. 2013 *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33:1706-13; Pisciotta, et al. 2012 *Circ Cardiovasc Genet* 5:42-50; Minicocci, et al. 2013 *J Lipid Res* 54:3481-90; Wang, et al. 2015 *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11630-5; Noto, et al. 2012 *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32:805-9; Martin-Campos, et al. 2012 *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 413:552-5) e, cosa ancora più importante, che questi cambiamenti lipidici associati alle mutazioni di

ANGPTL3 sono anche associati alla protezione dalle malattie cardiovascolari (Stitzziel, et al. 2017 *Journal of the American College of Cardiology*). Complessivamente, gli studi preclinici e le analisi genetiche sull'uomo suggeriscono che le terapie che inibiscono l'ANGPTL3 potrebbero ridurre l'LDL-C e apportare benefici nei pazienti con FH, compresi quelli affetti da malattia omozigote profonda, Evinacumab è un anticorpo monoclonale completamente umano che blocca specificamente l'ANGPTL3 (Gusarova, et al. 2015 *J Lipid Res* 56:1308-17). In volontari sani normali, evinacumab è stato ben tollerato e ha ridotto le tre principali frazioni lipidiche. È stato condotto uno studio di fase 2 per determinare se evinacumab riducesse i livelli di LDL-C in nove pazienti con HoFH geneticamente e fenotipicamente confermata, compresi i pazienti omozigoti per mutazioni nulle completamente prive di attività LDLR.

METODI

Pazienti: I nove pazienti (5 uomini, 4 donne) sono stati selezionati in base ai loro genotipi e fenotipi. Tutti presentavano un'anamnesi di LDL-C >500 mg per decilitro o >400 mg per decilitro dopo shunt portacavale, aterosclerosi precoce (8 su 9 con precedenti eventi cardiovascolari) e grave

xantomatosi, ed erano omozigoti o eterozigoti composti per mutazioni note che causano FH *LDLR* (Hobbs, *et al.* 1992 *Hum Mutat* 1:445-66). Tre pazienti erano omozigoti nulli. Tutti i pazienti erano in terapia lipidica massimamente tollerata.

Trattamento dello studio: I pazienti dovevano mantenere la loro abituale terapia di base per la riduzione dei lipidi e i regimi dietetici e di esercizio fisico per tutta la durata dello studio. Tutti i pazienti hanno ricevuto una singola dose in aperto di evinacumab 250 mg per via sottocutanea nell'area addominale durante la visita basale e una singola dose di evinacumab 15 mg per chilogrammo per via endovenosa 2 settimane dopo. Il prodotto farmaceutico evinacumab, sterile e liofilizzato, è stato fornito in una fiala di vetro monouso da 5 ml da ricostituire a una concentrazione di 100 mg per millilitro per le dosi sottocutanee e di 50 mg per millilitro per le dosi endovenose. I pazienti sono stati seguiti per un periodo fino a 24 settimane dopo la dose endovenosa, per consentire il lavaggio di evinacumab, e sono stati proposti per l'arruolamento in uno studio di estensione.

Valutazione farmacodinamica: Sono stati raccolti campioni di sangue a digiuno prima della

somministrazione del farmaco in studio, al basale e a intervalli regolari durante il periodo di trattamento in aperto e il periodo di follow-up di sicurezza, per la misurazione di LDL-C, non-HDL-C, colesterolo totale, HDL-C, apolipoproteina B, lipoproteina(a), trigliceridi, apolipoproteina A-1 e altri parametri. L'endpoint primario era la variazione percentuale media \pm deviazione standard (SD) dell'LDL-C dal basale alla quarta settimana.

RISULTATI

Anche se la maggior parte dei pazienti era in terapia massimamente tollerata, la media \pm SD dell'LDL-C basale era di 376,0 \pm 240,9 milligrammi per decilitro (mg/dL); un paziente che aveva fallito la terapia con statina, ed era stato rimosso dall'aferesi settimanale, aveva un LDL-C basale di 756 mg/dL. Tutti e nove i pazienti hanno riferito il verificarsi di almeno un evento avverso, ma nessuno ha portato all'interruzione del trattamento. Un evento (malattia coronarica dovuta a una patologia di base) è stato grave ma non è stato considerato correlato al farmaco in studio. Sei eventi sono stati considerati correlati al farmaco in studio, due dei quali erano reazioni al sito di iniezione di lieve entità, uno era una mialgia di moderata entità e uno era un'epistassi di grave entità.

Risposta ai farmaci: La variazione percentuale media \pm SD dell'LDL-C dal basale alla settimana 4 (endpoint primario prespecificato) dopo la somministrazione di evinacumab è stata di $-49\pm 23\%$ (intervallo: -90% a -25%), con una variazione assoluta dal basale di -157 ± 90 (intervallo: da -323 a -71) mg per decilitro (Tabella 1, di seguito). Il valore medio \pm SD di LDL-C raggiunto alla settimana 4 era di 219 ± 191 mg per decilitro. Nello stesso periodo, la variazione percentuale dell'apolipoproteina B è diminuita del $46\pm 18\%$ (Tabella 2, sotto), il non-HDL-C del $49\pm 22\%$ (Tabella 3, sotto), i trigliceridi del 47% (mediana, intervallo interquartile -57% -38%) e l'HDL-C del $36\pm 16\%$. La riduzione complessiva media \pm SD del picco di LDL-C verificatasi tra le settimane 4 e 12 è stata di $-58\pm 18\%$ (intervallo da -90% a -33%), con un picco assoluto di riduzione di LDL-C di 202 mg/dL. Alla settimana 4 (2 settimane dopo la dose endovenosa), un paziente ha ottenuto una riduzione dell'LDL-C superiore all' 80% . Nei 3 pazienti omozigoti nulli, la riduzione media \pm SD del picco di LDL-C alla settimana 12 è stata di $-48\pm 13\%$ (intervallo -60% -33%).

Tabella 1: Effetto dell'inibizione di AngPTL3 sulle concentrazioni plasmatiche di LDL-C

LDL-C	
Visita	Media della variazione percentuale rispetto al basale \pm SE (%)
BL (settimana 0)	0
Giorno 4	-12,8 \pm 3,7
Settimana 1	-24 \pm 7,0
Settimana 2	-30,2 \pm 8,1
Settimana 3	-41,4 \pm 8,3
Settimana 4	-49,2 \pm 7,7
Settimana 5	-46,8 \pm 5,1
Settimana 6	-52,1 \pm 4,9
Settimana 8	-51,6 \pm 6,0
Settimana 10	-45,6 \pm 4,6
Settimana 12	-36,6 \pm 6,4

Tabella 2: Effetto dell'inibizione di AngPTL3 sulle concentrazioni di apolipoproteina B

Apolipoproteina B	
Visita	Media della variazione percentuale rispetto al basale \pm SE (%)
BL (settimana 0)	0
Settimana 2	-24,2 \pm 7
Settimana 3	-38,6 \pm 7,3
Settimana 4	-45,9 \pm 6,1
Settimana 5	-42,3 \pm 4,7
Settimana 6	-43,1 \pm 4,9
Settimana 8	-42,7 \pm 4,8
Settimana 12	-29,5 \pm 7,2

Tabella 3: Effetto dell'inibizione di AngPTL3 sulle concentrazioni di non-HDL-C

Non HDL-C	
Visita	Media della variazione percentuale rispetto al basale \pm SE (%)
BL (settimana 0)	0
Giorno 4	-13,6 \pm 3,6
Settimana 1	-24,1 \pm 6,7
Settimana 2	-29,6 \pm 7,8
Settimana 3	-41,6 \pm 8
Settimana 4	-48,9 \pm 7,4
Settimana 5	-46,6 \pm 5,0
Settimana 6	-51,5 \pm 4,8
Settimana 8	-50,6 \pm 5,7
Settimana 10	-44,8 \pm 4,4
Settimana 12	-36,4 \pm 6,2

La somministrazione dell'anticorpo monoclonale completamente umano che blocca l'ANGPTL3, evinacumab, a nove adulti con HoFH, tra cui tre omozigoti nulli, ha portato a riduzioni significative delle LDL-C. È importante notare che queste riduzioni si sono aggiunte ai livelli basali già raggiunti con una terapia lipidica stabile e massimamente tollerata con o senza lomitapide, anticorpi monoclonali PCSK9 o shunt portacavale. Questi risultati forniscono una prova di concetto di una sostanziale riduzione aggiuntiva dell'LDL-C da parte di evinacumab, in aggiunta alla terapia standard, nel trattamento

dell'HoFH, con il potenziale di normalizzazione dell'LDL-C in alcuni pazienti che presentano livelli di LDL-C estremamente elevati. Evinacumab somministrato come iniezione sottocutanea da 250 mg al basale e come infusione endovenosa da 15 mg per chilogrammo alla settimana 2 è stato ben tollerato. In un recente studio prima negli umani su volontari sani, evinacumab ha dimostrato di ridurre l'LDL-C e di essere ben tollerato in un numero maggiore di pazienti (Dewey, *et al.* 2017 *New Engl J Med*; in stampa). Tutti i nove pazienti, compresi i tre omozigoti nulli privi di attività LDLR, hanno dimostrato riduzioni clinicamente significative dell'LDL-C rispetto al basale. Insieme ai recenti studi preclinici e alle analisi genetiche sull'uomo, i risultati suggeriscono che l'inibizione dell'Angptl3 può non solo ridurre l'LDL-C e i trigliceridi, ma anche fornire protezione dalle malattie cardiovascolari. Questi studi forniscono una speranza concreta per un trattamento ben tollerato e d'impatto per i pazienti affetti da ipercolesterolemia familiare profonda. In base alle analisi della Cholesterol Treatment Trialists' Collaboration (CTTC) (Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaboration 2010 *Lancet* 376:1670-81), una riduzione assoluta di 39 mg/dL di LDL-C corrisponde a una riduzione del rischio

relativo del 22% nell'arco di 4-5 anni di trattamento con statine; recenti dati sugli esiti con un anticorpo PCSK9 supportano riduzioni del rischio simili per unità di riduzione di LDL-C quando si tiene conto di una durata del trattamento più breve (Sabatine, et al. 2017 *N Engl J Med* 3-17-2017 e-publication; in stampa). Insieme ai dati genetici sugli effetti protettivi delle mutazioni di ANGPTL3 sul rischio cardiovascolare (Stitzziel, et al. 2017 *Journal of the American College of Cardiology* 69(16):2054-2063), le riduzioni assolute di 150-200 mg/dL ottenute con evinacumab nei pazienti con HoFH potrebbero avere un beneficio senza precedenti per questi pazienti ad altissimo rischio. Il meccanismo che ha portato a riduzioni così ampie dell'LDL-C è attualmente oggetto di studio. Evinacumab allevia la normale inibizione, da parte dell'ANGPTL3, sia della lipoproteina lipasi (uno dei principali regolatori dei trigliceridi) sia della lipasi endoteliale (un regolatore dell'HDL-C) (Shimamura, et al. 2007 *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:366-72); pertanto, l'abbassamento di trigliceridi e HDL-C da parte di evinacumab. I risultati immediati, combinati con quelli di un recente studio *in vivo* (Wang, et al. 2015 *J Lipid Res* 56:1296-307), suggeriscono che gli effetti di

evinacumab sulle LDL-C coinvolgono una combinazione di meccanismi canonici e non canonici che agiscono a monte della formazione delle particelle LDL. In un modello murino, l'inattivazione di ANGPTL3 con evinacumab non ha influenzato il numero di VLDL secrete dal fegato, ma ha alterato qualitativamente le particelle VLDL prodotte. Dopo la secrezione, le VLDL vengono rapidamente idrolizzate per formare resti di VLDL più poveri di trigliceridi a causa dell'up-regulation della lipoproteina lipasi indotta da evinacumab, che può aumentare la loro clearance attraverso recettori diversi da quelli delle LDL. Per quanto riguarda le modeste riduzioni osservate con l'HDL-C, le ampie analisi genetiche precedenti che coinvolgono la lipasi endoteliale (Voight, et al. 2012 *Lancet* 380:572-80), così come i recenti risultati genetici con protezione da ANGPTL3 (Dewey 2017, Stitziel 2017), sono coerenti con l'opinione emergente che i livelli di HDL-C non influenzano direttamente il rischio cardiovascolare (Ko, et al. 2016 *Journal of the American College of Cardiology* 68:2073-83).

I pazienti C e G hanno ricevuto in concomitanza la lomitapide, un inibitore della proteina di trasferimento dei trigliceridi microsomiali, durante lo studio. Questi pazienti hanno mostrato una

riduzione del 90% e del 44% delle LDL-C, rispettivamente, 2 settimane dopo la somministrazione di evinacumab per via endovenosa, sollevando l'ipotesi di una sinergia moltiplicativa tra la lomitapide (che influisce sulla produzione di VLDL) e l'evinacumab (che influisce sulle caratteristiche delle VLDL secrete). Tuttavia, il paziente D non ha ricevuto la lomitapide e ha mostrato una riduzione del 77% dell'LDL-C alla quarta settimana.

I risultati qui riportati forniscono la prova di concetto che l'inibizione dell'ANGPTL3 con evinacumab porta a una sostanziale riduzione aggiuntiva dell'LDL-C nei pazienti con HoFH in terapia lipidica stabile, compresi quelli che presentano mutazioni nulle/nulle. La terapia aggiuntiva con evinacumab ha permesso di normalizzare le concentrazioni di LDL-C in quattro partecipanti allo studio HoFH. Ad esempio, la paziente C, una donna di 47 anni, presentava valori di LDL-C superiori a 800 mg per decilitro all'età di 26 anni. Il suo profilo lipidico è progressivamente migliorato (raggiungendo i 150-170 mg per decilitro) con la successiva introduzione di statine ad alto dosaggio, ezetimibe e lomitapide. L'LDL-C ha raggiunto 15 mg per decilitro alla settimana 4, 2 settimane dopo la somministrazione di evinacumab per via endovenosa.

Esempio 3: Inibizione dell'ANGPTL3 da parte di evinacumab ha ridotto i trigliceridi (TG) e l'LDL-C in soggetti che presentavano modesti aumenti dei TG e/o dell'LDL-C

Elevazioni di LDL-C e TG sono state collegate a un aumento del rischio di CHD. Recenti scoperte hanno dimostrato un ruolo centrale dell'angiopoietina simile - 3 (ANGPTL3) nel metabolismo dei lipidi. La perdita di funzione (LoF) di ANGPTL3 nell'uomo è stata associata a riduzioni di TG, LDL-C e HDL-C. Evinacumab è un anticorpo monoclonale umano specifico per l'ANGPTL3 in fase di sviluppo per il trattamento della dislipidemia, compresa l'ipertrigliceridemia e l'ipercolesterolemia.

Metodi: Lo studio in questione è uno studio di fase 1, prima in umani, in doppio cieco, ascendente, controllato con placebo (PBO), di evinacumab somministrato per via sottocutanea (SC) o endovenosa (IV) in soggetti con innalzamento dei TG ($150 \leq \text{TG} \leq 450$ mg/dL) e/o delle LDL C (≥ 100 mg/dL). Ottantatré soggetti sono stati randomizzati allo studio (9 in PBO SC; 12 in PBO IV; 11 in 75 mg SC; 12 in 150 mg SC, 9 in 250 mg SC, 10 in 5 mg/kg IV, 9 in 10 mg/kg IV e 11 in 20 mg/kg IV).

Risultati: Evinacumab si è dimostrato ben tollerato in

questo studio. Quarantuno (41) soggetti hanno riportato almeno un evento avverso emergente dal trattamento (TEAE): 32[± 51,6%] nel gruppo evinacumab vs. 9[± 42,9%] nel gruppo PBO. Nessuno era grave e nessun soggetto ha interrotto a causa di un TEAE. I TEAE più frequenti sono stati la cefalea (7 [11,3%] vs. 0 [0%]) e gli aumenti di ALT/AST [$>2X$ ULN] (5 soggetti trattati vs. 1 soggetto PBO). Non è stato riscontrato un trend di sicurezza correlato alla dose. Le riduzioni massime dei TG sono state osservate il giorno 4, con una variazione percentuale mediana dal basale compresa tra -1,0% e -75,0% per le dosi di evinacumab e +25,3% per il PBO. Le variazioni percentuali medie di LDL-C dal basale al giorno 11 sono state comprese tra -3,4% e -25,5% per le dosi di evinacumab e +10,2 per il PBO. La durata della riduzione dei TG e delle LDL è stata dose-dipendente e si è estesa rispettivamente a 64 e 43 giorni dopo la somministrazione di 20 mg/kg di evinacumab per via endovenosa. Sono state osservate anche riduzioni dose-dipendenti di HDL-C, VLDL-C, colesterolo totale, non-HDL-C, ApoA1 e ApoB, ma non ci sono stati effetti apparenti sulla Lp(a).

La somministrazione di evinacumab in soggetti sani con TG e/o LDL-C moderatamente elevati è stata

generalmente ben tollerata. Inoltre, evinacumab ha indotto riduzioni rapide e sostanziali dei TG, nonché riduzioni di LDL-C e HDL-C, ricapitolando l'ipolipoproteinemia osservata nei soggetti omozigoti per mutazioni ANGPTL3 LOF.

RIVENDICAZIONI

1. Inibitore della proteina 3 simile all'angiopoietina (ANGPTL3) per l'uso in un metodo di trattamento di un paziente affetto da ipercolesterolemia familiare in associazione a una statina e a due agenti di riduzione di lipidi diversi da una statina, in cui il metodo comprende la somministrazione al paziente di una quantità terapeuticamente efficace di statina, dei due agenti di riduzione di lipidi diversi da una statina e di un inibitore di ANGPTL3, in cui

- l'inibitore di ANGPTL3 è evinacumab;

- la statina è selezionata dal gruppo costituito da atorvastatina, pitavastatina, lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina e rosuvastatina; e

- il primo agente di riduzione di lipidi, diverso da una statina, è un agente che inibisce l'assorbimento del colesterolo.

2. Inibitore di ANGPTL3 per l'uso secondo la

rivendicazione 1, in cui l'ipercolesterolemia familiare è selezionata dal gruppo costituito da ipercolesterolemia familiare eterozigote (HeFH) e ipercolesterolemia familiare omozigote (HoFH).

3. Inibitore di ANGPTL3 per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui:

(a) la statina è atorvastatina somministrata per via orale una volta al giorno a una dose compresa tra circa 10 mg e circa 80 mg; o

(b) la statina è rosuvastatina, somministrata per via orale una volta al giorno a una dose compresa tra circa 5 mg e circa 40 mg; o

(c) l'agente che inibisce l'assorbimento del colesterolo è ezetimibe, facoltativamente in cui ezetimibe viene somministrato per via orale una volta al giorno a una dose di circa 10 mg.

4. Inibitore di ANGPTL3 per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il secondo agente di riduzione di lipidi diverso da una statina è un agente che inibisce la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTTP), facoltativamente in cui:

(a) l'agente che inibisce MTTP è lomitapide; o

(b) l'agente che inibisce MTTP è lomitapide e la lomitapide viene somministrata per via orale una volta al giorno a una dose compresa tra circa 5 mg e circa

60 mg, facoltativamente in cui la lomitapide viene somministrata per via orale una volta al giorno a una dose di circa 20 mg.

5. Inibitore di ANGPTL3 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui:

(a) evinacumab viene somministrato prima, durante o dopo il trattamento con una statina, ezetimibe o lomitapide;

(b) evinacumab viene somministrato per via endovenosa a una dose compresa tra circa 1 mg/kg e circa 20 mg/kg di peso corporeo, ad esempio a una dose di circa 15 mg/kg di peso corporeo;

(c) evinacumab viene somministrato per via sottocutanea a una dose compresa tra circa 50 mg e circa 750 mg, ad esempio a una dose compresa tra circa 250 mg e circa 450 mg; o

(d) evinacumab viene somministrato ogni settimana, ogni due settimane, ogni 3 settimane, ogni 4 settimane, ogni 2 mesi, ogni 3 mesi o ogni 4 mesi.