

FARMAKOTERAPIA CHOROÓB UKŁADU KRAŻENIA

Redaktor działu: prof. dr hab. n. med. Beata Wożakowska-Kapłon

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego

Monoclonal antibodies usage in cardiovascular diseases therapy

Barbara Sosnowska-Pasiarska¹, Marcin Pasiarski², Beata Wożakowska-Kapłon^{1, 3}¹Klinika Kardiologii i Elektroterapii Świętokrzyskiego Centrum Kardiologii w Kielcach²Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku Świętokrzyskiego Centrum Kardiologii w Kielcach³Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

STRESZCZENIE

Przeciwciała monoklonalne są przeciwciałami swoiście rozpoznającymi z podobnym powinowactwem jeden rodzaj antygeny. Dzięki inżynierii genetycznej możliwe jest również tworzenie przeciwciał w pełni ludzkich. Zastosowanie nowych wysoce selektywnych leków, których cel molekularny jest ściśle zdefiniowany, może umożliwić zatrzymanie rozwoju choroby, jej remisję lub nawet całkowite wyleczenie. Zatem terapia celowana dzięki wysokiej swoistości zwiększa szanse na opanowanie procesu chorobowego. W niniejszej pracy przedstawiono przeciwciała monoklonalne stosowane w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego oraz wybrane substancje pozostające obecnie na etapie badań klinicznych.

Choroby Serca i Naczyń 2014, 11 (6), 342–347

Słowa kluczowe: przeciwciała monoklonalne, choroby układu sercowo-naczyniowego, terapia celowana

ABSTRACT

Monoclonal antibodies identify one type of antigen with similar affinity. Human monoclonal antibodies are produced by means of genetic engineering. Usage of new high selective drugs of molecular target may lead to disease inhibition, remission or even total healing. Therefore targeted therapy to its high specificity increases chances to disease inhibition. In this article usage of monoclonal antibodies in treatment of cardiovascular diseases are presented and also selected substances in ongoing clinical trials are described.

Choroby Serca i Naczyń 2014, 11 (6), 342–347

Key words: monoclonal antibodies, cardiovascular diseases, targeted therapy

WPROWADZENIE

Przeciwciała monoklonalne są przeciwciałami swoiście rozpoznającymi z podobnym powinowactwem jeden rodzaj antygeny. Ze względu na technologię ich

produkcji przeciwciała te dzieli się na mysie, chimeryczne, humanizowane oraz w pełni ludzkie. W latach 70. ubiegłego wieku Köhler i Milstein [1, 2] opracowali metodę produkcji mysich przeciwciał monoklonalnych. Są one coraz rzadziej stosowane w terapii ze względu na swoją wysoką immunogenność oraz ryzyko wystąpienia poważnych powikłań, łącznie ze wstrząsem anafilaktycznym wynikającym z odpowiedzi immunologicznej na białko obcogatunkowe. Obecnie produkowanymi

Adres do korespondencji:

lek. Barbara Sosnowska-Pasiarska
I Klinika Kardiologii i Elektroterapii
Świętokrzyskie Centrum Kardiologii
ul. Grunwaldzka 45, 25–736 Kielce
tel.: 41 367 13 91/13 88, faks: 41 367 13 96
e-mail: repikus@poczta.onet.pl

przeciwciałami złożonymi z białek pochodzących częściowo od zwierząt (np. myszy, chomika, szczura) i od człowieka są przeciwciała chimeryczne oraz humanizowane. Przeciwciała chimeryczne w około 75% składają się z sekwencji ludzkich, natomiast humanizowane — w około 95%. Podczas produkcji przeciwciał modyfikuje się geny w taki sposób, aby jedynie sekwencje kodujące regiony hiperzmiennne pochodziły od myszy, a pozostała część sekwencji genów — od człowieka. Dzięki inżynierii genetycznej możliwe jest również tworzenie przeciwciał monoklonalnych w pełni ludzkich [3]. Wprowadzono jednolite międzynarodowe nazewnictwo przeciwciał monoklonalnych. Przy tworzeniu nazw przeciwciał używa się końcówki „-mab”, przy czym jeśli przeciwciało pochodzi od myszy, to końcówka powinna być poprzedzona literą „o”, na przykład edrecolomab, w przypadku przeciwciał chimerycznych — wstawką „-xi-” (w mianownictwie polskim „-ksy-”), na przykład infliksymab, humanizowanych — wstawką „-zu-”, na przykład bewacyzumab, ludzkich zaś — wstawką „-u-”, na przykład adalimumab.

Przeciwciała monoklonalne mogą się składać z pełnej cząsteczki immunoglobulinowej — są wówczas najbardziej zbliżone do naturalnych, ale jednocześnie ich możliwość penetracji do różnych rodzajów tkanek jest ograniczona. Częściej wykorzystuje się cząsteczki pochodne, takie jak fragmenty Fab, fragmenty Fv bądź też rekombinowane jednołańcuchowe białka mogące wiązać antygen (scFv, *single chain Fv*). Wszystkie te cząsteczki zachowują zdolność do wiązania antygeny, a jednocześnie umożliwiają tworzenie różnych konfiguracji zwiększających ich powinowactwo i awidność (ang. *avidity*, 'zachłanność') w stosunku do określonego antygeny. Ponadto umożliwiają wytwarzanie cząsteczek o więcej niż jednej specyficzności antygenowej. Działanie przeciwciał monoklonalnych jest różne, jednak najczęściej jest wykorzystywane ich działanie immunologiczne — niszczenie komórek w procesie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) lub cytotoksyczności zależnej od układu dopełniacza. Zdecydowana większość przeciwciał monoklonalnych oddziałuje przez blokowanie różnych mediatorów: czynników wzrostu, cytokin, cząsteczek związanych z przekazywaniem sygnału. Ponadto przeciwciała monoklonalne mogą być nośnikami innych cząsteczek, które za ich pomocą są dostarczane bezpośrednio do wybranego celu komórkowego czy molekularnego. Z przeciwciałami monoklonalnymi są związane radioizotopy, toksyny, enzymy, cytokiny i wiele innych

cząsteczek. Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w medycynie jest bardzo szerokie. Stosuje się je zarówno w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej (np. immunofenotypowanie komórek metodami laserowej cytometrii przepływownej), jak i w terapii wielu chorób. Przeciwciała monoklonalne są szeroko wykorzystywane w leczeniu chorób onkologicznych (np. rak okrężnicy — bewacyzumab, przewlekła białaczka limfocytowa — rytuksymab), chorób autoimmunizacyjnych i zapalnych (np. reumatoidalne zapalenie stawów — infliksymab, stwardnienie rozsiane — natalizumab), a także stosowane w transplantologii jako leki hamujące proces odrzucania przeszczepu (np. muromonab) oraz w leczeniu chorób zakaźnych (np. paliwizumab — anty-RSV) czy też w terapii astmy oskrzelowej (omalizumab — anty-IgE) [4, 5].

W niniejszej pracy przedstawiono przeciwciała monoklonalne stosowane obecnie w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego oraz wybrane substancje pozostające w fazie badań klinicznych.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE PO TRANSPLANTACJI SERCA

Celem stosowania przeciwciał monoklonalnych w transplantologii jest profilaktyka lub leczenie epizodów ostrego odrzucania przeszczepu. Pierwszym stosowanym w terapii przeciwciałem monoklonalnym zatwierdzonym w 1986 roku w Stanach Zjednoczonych przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) było mysie przeciwciało IgG2a anty-CD3 o nazwie muromonab, które znalazło zastosowanie w transplantologii w profilaktyce reakcji odrzucenia przeszczepu nerki u pacjentów, którzy wykazywali oporność na steroidowe leki przeciwzapalne [6]. Kolejnym przeciwciałem wprowadzonym w 1997 roku w profilaktyce odrzucenia przeszczepu był daklizumab — humanizowane przeciwciało IgG1 selektywnie wiążące się z podjednostką TAC receptora dla interleukiny 2 na aktywowanych limfocytach T i niedopuszczające do ich dalszej proliferacji klonalnej. Lek ten nie wpływa na spoczynkowe limfocyty T i nie zmniejsza ich liczby [7]. Obecnie w schematach leczenia immunosupresyjnego po przeszczepieniu serca stosuje się bazyliksymab — chimeryczne przeciwciało skierowane przeciwko podjednostce alfa receptora dla interleukiny 2 (IL-2R α , anty-CD25) na aktywowanych limfocytach T, hamujące dalszą ich proliferację, niewpływające natomiast na spoczynkowe limfocyty T i niezmniejszające liczby limfocytów T [8]. W trakcie badań nad zastosowaniem w profilaktyce

odrzućcia przeszczepu serca pozostają alemtuzumab oraz rytuksymab [9, 10].

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE W PREWENCJI ZAKRZEPÓW PO ZABIEGACH REWASKULARYZACYJNYCH

W 1994 roku FDA zatwierdziła do stosowania w chorobach układu sercowo-naczyniowego w celu hamowania krzepnięcia krwi abciksymb, chimeryczne przeciwciało IgG1 skierowane przeciwko receptorowi odpowiedzialnemu za agregację płytek krwi (PLT, *platelets*) — kompleksowi glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa). Abciksymb łączy się z receptorami GPIIb/IIIa aktywnych PLT, które są częścią receptorów adhezyjnych z rodziny integryn i głównymi receptorami powierzchniowymi PLT związanymi z procesem agregacji. Abciksymb hamuje agregację PLT, uniemożliwiając ich łączenie się z fibrynogenem, czynnikiem von Willebranda i innymi cząsteczkami adhezyjnymi. Poprzez łączenie się z receptorem witronektynowym PLT i komórek śródbłonna lek ten skuteczniej od związków hamujących tylko receptory GPIIb/IIIa blokuje nasiloną generację trombiny występującą po aktywacji PLT. Czynność PLT zwykle wraca do normy po 48 godzinach, choć abciksymb pozostaje we krwi w stanie związanym z PLT 10–15 dni. Znalazł on zastosowanie w leczeniu skojarzonym z kwasem acetylosalicylowym i heparyną niefrakcjonowaną u chorych z grupy wysokiego ryzyka z ostrymi zespołami wieńcowymi (ACS, *acute coronary syndrome*) w trakcie przezskórnych zabiegów na naczyniach wieńcowych [11].

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE W LECZENIU HIPERCHOLESTEROLEMII

Zaburzenia gospodarki lipidowej stanowią jeden z podstawowych czynników patogenetycznych miażdżycy, przyczyniając się do rozwoju choroby wieńcowej, miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych czy udaru mózgu. Za powstawanie blaszek miażdżycowych odpowiada cholesterol frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-C, *low-density lipoprotein cholesterol*), która pochodzi z pożywienia oraz z endogennej syntezy zachodzącej głównie w hepatocytach. Cholesterol po wchłonięciu w jelitach jest transportowany do wątroby i innych tkanek przez LDL. Po związaniu z receptorem dla LDL (LDLR, *LDL receptor*), znajdującym się na powierzchni błon komórkowych, cząsteczka LDL jest przenoszona do wnętrza komórek, a następnie receptor powraca do błony komórkowej, gdzie może ponownie związać LDL [12]. Wychwyt LDL przez hepatocyty jest uwarunkowany ilo-

ścią LDLR. Zwiększenie liczby dostępnych wątrobowych LDLR powoduje obniżenie stężenia LDL-C w osoczu, natomiast zmniejszenie liczby LDLR wywołuje hipercholesterolemię. Regulatorem dostępności LDLR, a tym samym stężenia LDL-C we krwi, jest białko — konwertaza proproteinowa subtylizyna/keksyna typu 9 (PCSK9, *proprotein convertase subtilisin kexin 9*), niekiedy określane jako NARC-1 (*neural apoptosis-regulated convertase 1*); jest to proteaza serynowa [13]. Białko PCSK9 wiąże się z LDLR poprzez jego fragment zbliżony strukturalnie do nabłonkowego czynnika wzrostu A (EGF-A, *epidermal growth factor-like repeat A*), z kolei PCSK9 związane z fragmentem EGF-A LDLR zatrzymuje LDLR w komórce i przekazuje do lizosomów, gdzie ulegają one degradacji [14, 15]. Shan i wsp. [16] otrzymali syntetyczny peptyd EGF-A, który — wiążąc się z PCSK9 — blokował jego wiązanie z LDLR, co zapobiegało degradacji LDLR przez PCSK9. Zatem PCSK9 powoduje zmniejszenie gęstości LDLR na powierzchni hepatocytów, a tym samym ogranicza liczbę LDL, które mogą ulec internalizacji i metabolizmowi w tych komórkach, zwiększenie ekspresji PCSK9 pociąga za sobą wzrost stężenia LDL-C w osoczu, a zahamowanie ekspresji — jego obniżenie. Niskie pH wnętrza komórki równe 5 powoduje zwiększenie o 150 razy powinowactwa PCSK9 do EGF.

W doświadczeniach prowadzonych na zwierzętach (myszy, szczury, małpy) udowodniono, że zahamowanie ekspresji genów dla PCSK9 powodowało wzrost liczby wątrobowych LDLR i spadek stężenia cholesterolu w osoczu [17, 18]. Zwiększeniu liczby LDLR w wątrobie nie towarzyszyło zwiększenie ich mRNA, co wskazuje, że było ono wynikiem zahamowania ich destrukcji, a nie zwiększenia ekspresji. Zahamowanie genu PCSK9 nie wpływało na frakcję lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL, *high-density lipoprotein*) ani triglicerydy. Z kolei nadekspresja genu dla PCSK9 prowadzi do zmniejszenia liczby LDLR i wzrostu stężenia cholesterolu [19–21].

Bezpośrednim aktywatorem ekspresji genów dla LDLR i PCSK9 w komórkach jest czynnik transkrypcyjny SREBP-2 (ang. *sterol regulatory element binding proteins*) [22–26]. Statyny aktywują SREBP-2, który pobudza ekspresję zarówno PCSK9, jak i LDLR. Zahamowanie ekspresji PCSK9 nasila efekt działania statyn, natomiast jej zwiększenie może być przyczyną oporności na statyny [27–29]. Ponadto u myszy stwierdzono nasilenie działania tych leków obniżającego stężenie cholesterolu we krwi [30].

Nasilenie zmian miażdżycowych wiąże się z występowaniem w organizmie procesów zapalnych, gdyż

wykazano, że infekcje i stan zapalny prowadzą do zaburzenia metabolizmu lipidów, a zwłaszcza do obniżonego wychwytu LDL-C [31]. Infekcja oraz jałowe zapalenie powodują u myszy wielokrotny wzrost ekspresji PCSK9 w wątrobie i nerkach oraz zmniejszenie ilości receptorów LDL w wątrobie z następczym wzrostem stężenia LDL-C w osoczu [32].

U podłoża hipercholesterolemii rodzinnej dziedzicznej w sposób autosomalny dominujący prowadzącej do przedwczesnego rozwoju miażdżycy leżą mutacje genów kodujących LDLR, genu apolipoproteiny B-100 oraz mutacje genu PCSK9 (F216L i S127R) [33–36]. Doświadczenia na zwierzętach oraz *in vitro* na hodowlach komórek zwierzęcych i ludzkich dostarczyły bardziej bezpośrednich dowodów oraz pozwoliły na wyjaśnienie mechanizmów działania PCSK9 [37–40].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach II i III fazy nad nowymi lekami — przeciwciałami skierowanymi przeciwko PCSK9 (ewolokumab, alirokumab, bokocyzumab) — wykazano istotne zmniejszenie stężenia cholesterolu frakcji LDL w surowicy osób z hipercholesterolemią. Najczęstsze działania niepożądane leków z tej grupy to: bóle głowy, biegunka, nudności, infekcje układu moczowego. Do najczęstszych działań niepożądanych ewolokumabu należą zapalenie błony śluzowej nosa i gardła, infekcje górnych dróg oddechowych, grypa, bóle stawów i bóle pleców.

Ewolokumab

Ewolokumab jest ludzkim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko PCSK9. W badaniach I i II fazy wykazano korzyści ze stosowania tego leku u chorych z nieprawidłowym stężeniem LDL-C [41]. Skuteczność ewolokumabu oceniano w następujących badaniach: MENDEL — u chorych z hipercholesterolemią, którzy w ogóle nie otrzymywali statyn, LAPLACE-TIMI-57 — u chorych z hipercholesterolemią w trakcie terapii statyną i z zawałem serca, RUTHERFORD — u chorych z heterozygotyczną postacią hipercholesterolemii rodzinnej, GAUSS — u chorych z hipercholesterolemią i nietolerancją statyn. Aby ocenić długoterminową efektywność i bezpieczeństwo terapii ewolokumabem, zaprojektowano badanie OSLER (*Open-Label Study of Long-Term Evaluation Against LDL-C*), do którego włączono ponad 1100 chorych obserwowanych przez rok. Po trwającym 52 tygodnie leczeniu, w porównaniu z placebo, stwierdzono 52,3-procentowe obniżenie stężenia LDL-C. W długoterminowej III fazie badania OSLER zakłada się włączenie

ponad 28 000 pacjentów; co 2 tygodnie lub co miesiąc w poszczególnych populacjach chorych ma być podawany ewolokumab: 1) u chorych z hipercholesterolemią — w połączeniu ze statynami (LAPLACE-2), u chorych z hipercholesterolemią nietolerujących statyn (GAUSS-2), w monoterapii w porównaniu z placebo (MENDEL-2), u heterozygotycznych chorych z hipercholesterolemią rodzinną (RUTHERFORD-2), u homozygotycznych chorych z hipercholesterolemią rodzinną (TESLA, TAUSSIG) oraz w monoterapii w porównaniu z placebo w badaniu FOURIER (ocena redukcji ryzyka sercowo-naczyniowego). W badaniu GAUSS-2 (randomizowane, przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby badanie III fazy, kontrolowane placebo i w porównaniu z ezetimibem) w trwającej 12 tygodni obserwacji u osób leczonych ewolokumabem nietolerujących statyn w dawkach terapeutycznych stwierdzono obniżenie stężenia LDL-C o 53–56% w porównaniu z grupą przyjmującą placebo oraz o 37–39% w porównaniu z grupą leczoną ezetimibem [42, 43]. W badaniu MENDEL-2 (randomizowane badanie III fazy z zastosowaniem ewolokumabu w porównaniu z doustnym ezetimibem, kontrolowane placebo) wykazano, że ewolokumab obniża stężenie LDL-C o 55–57% w porównaniu z grupą przyjmującą placebo oraz o 38–40% w porównaniu z grupą leczoną ezetimibem [44].

Alirokumab

Alirokumab (SAR236553/REGN727) jest w pełni ludzkim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko PCSK9, podawanym w iniekcjach podskórnych [45]. Wykazano, że lek ten znacząco zmniejszył stężenie LDL-C zarówno w grupach zdrowych ochotników, jak i u pacjentów z rodzinną lub wielogenową postacią hipercholesterolemii leczonych statynami. Roth i wsp. [46] przedstawili wyniki wskazujące, że dodanie alirokumabu do atorwastatyny w dawce 80 mg zmniejsza stężenie LDL-C o 73%. Wyniki badania ODYSSEY MONO wykazały, że alirokumab podawany w dawce 75 mg co 2 tygodnie obniżał stężenie LDL-C o 55% w trwającej 12 tygodni obserwacji i efekt ten utrzymywał się przez 24 tygodnie [47]. Wyniki powyższych badań sugerują, że podawanie alirokumabu łącznie ze statynami może przynieść korzyści chorym, którzy nie mogą osiągnąć zalecanej wartości LDL-C mimo zastosowania dużej dawki statyn lub występują u nich działania niepożądane wynikające ze stosowania statyn. Założono, że w badaniu ODYSSEY OUTCOMES III fazy weźmie udział około 18 000 pacjentów, u których w niedawnej przeszłości

wystąpił ACS. To randomizowane, kontrolowane placebo badanie jest prowadzone metodą podwójnie ślepej próby i ma zasięg międzynarodowy. Jego pierwszorzędowy punkt końcowy to ocena wpływu przeciwciała anty-PCSK9 na częstość występowania incydentów sercowo-naczyniowych u pacjentów, u których wystąpił ACS i nie osiągnięto docelowej wartości stężenia LDL-C.

Bokocyzumab

Wyniki badania fazy IIb nad bokocyzumabem były pozytywne, ponieważ wykazano 52-procentowe obniżenie LDL-C u chorych leczonych łącznie bokocyzumabem i statyną w porównaniu z chorymi leczonymi wyłącznie statyną poddanymi randomizacji do grupy przyjmującej placebo [48]. W październiku 2013 roku rozpoczęły się badania SPIRE-1 i SPIRE-2, w których zaplanowano włączenie 22 000 chorych.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE JAKO ANTIDOTUM DLA LEKU PRZECIWKRZEPLIWEGO Idaruczumab — antidotum dla dabigatranu

Dabigatran to doustny inhibitor trombiny stosowany w prewencji epizodów zakrzepowo-zatorowych u chorych po zabiegach ortopedycznych, w leczeniu i prewencji żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej oraz u chorych z migotaniem przedsionków i obciążonych wysokim ryzykiem powikłań zakrzepowo-zatorowych ocenianym według skali CHA₂DS₂VASc. Dotychczas nie znano swobodnego antidotum odwracającego działanie doustnych antykoagulantów *non-K* (niebędących antagonistami witaminy K), a w przypadku występowania dużych powikłań krwotocznych stosowano leczenie objawowe [49, 50].

Idaruczumab (BI 655075) jest fragmentem (Fab) ludzkiego przeciwciała skierowanego przeciwko dabigatranowi. W badaniach na zwierzętach potwierdzono skuteczność neutralizowania dabigatranu przez swoiste przeciwciała [51–53]. Zakończono również badanie I fazy (NCT01688830) (randomizowane, prowadzone metodą podwójnie ślepej próby badanie, kontrolowane placebo) u zdrowych ochotników, którzy otrzymywali dabigatran (220 mg 2×/d. przez 3 dni), a następnie idaruczumab. Włączono do niego 145 mężczyzn. W pierwszym etapie badania oceniano tolerancję fragmentu przeciwciała podawanego we wlewie dożylnym w zwiększanych dawkach (do 8 g), w drugim natomiast — możliwość odwrócenia działania przeciwkrzepliwego dabigatranu poprzez zastosowanie 5-minutowych wlewów dożylnych leku w trzech różnych dawkach (1 g, 2 g i 4 g). Pięciominutowy

wlew antidotum zapewniał szybkie, całkowite i trwałe odwrócenie przeciwkrzepliwego wpływu dabigatranu, a w przypadku dawek 2 g i 4 g efekt odwrócenia wpływu antykoagulantu utrzymał się przez ponad 12 godzin po zakończeniu podawania leku. Wszystkie podane dawki antidotum dla dabigatranu zawierające fragment przeciwciała były dobrze tolerowane [54]. W 2014 roku rozpoczęto badanie III fazy z zastosowaniem idaruczumabu u chorych stosujących dabigatranu, u których wystąpiło duże krwawienie lub u chorych wymagających pilnego zabiegu chirurgicznego.

PODSUMOWANIE

Rozwój nauk podstawowych, między innymi biotechnologii, inżynierii genetycznej czy immunologii klinicznej i doświadczalnej, umożliwia zastosowanie nowych wysoce selektywnych leków, których cel molekularny jest ściśle zdefiniowany i którego inaktywacja lub usunięcie prowadzi do zatrzymania rozwoju choroby, jej remisji lub nawet całkowitego wyleczenia. Terapia celowana zatem, dzięki wysokiej swoistości, zwiększa szanse na opanowanie procesu chorobowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495–497.
2. Köhler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976; 6: 511–519.
3. Gołąb J., Jakóbskiak M., Lasek W. i wsp. Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013: 21–46.
4. Glassman P.M., Balthasar J.P. Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Biol. Med.* 2014; 11: 20–33. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.002.
5. Shukra A.M., Sridevi N.V., Dev Chandran D., Maithal K. Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp.)* 2014; 2: 91–98. doi: 10.1556/EuJMI.4.2014.2.1.
6. Loertscher R. The utility of monoclonal antibody therapy in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 2002; 34: 797–800.
7. Mueller X.M. Drug immunosuppression therapy for adult heart transplantation. Part 1: immune response to allograft and mechanism of action of immunosuppressants. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; 77: 354–362.
8. Kieć-Kononowicz K. Terapeutyczne przeciwciała monoklonalne i białka fuzyjne zawierające ich elementy. *Farm. Pol.* 2007; 63: 183–198.
9. Cahoon W.D., Ensor C.R., Shullo M.A. Alemtuzumab for cytolytic induction of immunosuppression in heart transplant recipients. *Prog. Transplant.* 2012; 22: 344–349; quiz 350.
10. Ravichandran A.K., Schilling J.D., Novak E. i wsp. Rituximab is associated with improved survival in cardiac allograft patients with antibody-mediated rejection: a single center review. *Clin. Transplant.* 2013; 27: 961–967. doi: 10.1111/ctr.12277.
11. De Luca G., Navarese E., Marino P. Risk profile and benefits from GP IIb/IIIa inhibitors among patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty: a meta-regression analysis of randomized trials. *Eur. Heart J.* 2009; 30: 2705–2713.
12. Costet P., Krempf M., Cariou B. PCSK9 and LDL cholesterol: unraveling the target to design the bullet. *Trends Biochem. Sci.* 2008; 33: 426–434.
13. Seidah N.G., Benjannet S., Wickham L. i wsp. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 928–933.

14. Zhang D.W., Lagace T.A., Garuti R. i wsp. Binding protein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 18 602–18 612.
15. Fisher T.S., Lo Surdo P., Pandit S. i wsp. Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20 502–12 512.
16. Shan L., Pang L., Zhang R. i wsp. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2008; 375: 469–473.
17. Frank-Kamenetsky M., Grefhorst A., Anderson N.N. i wsp. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 11 915–11 920.
18. Graham M.J., Lemonidis K.M., Whipple C.P. i wsp. Antisense inhibition of protein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J. Lipid. Res.* 2007; 48: 763–767.
19. Lagace T.A., Curtis D.E., Garuti R. i wsp. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 2995–3005.
20. Maxwell K.N., Breslow J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 7100–7105.
21. Hammer R.E., Horton J.D. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 2995–3005.
22. Park S.W., Moon Y.A., Horton J.D. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by pro protein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 50 630–50 638.
23. Jeong H.J., Lee H.S., Kim K.S. i wsp. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J. Lipid. Res.* 2008; 49: 399–409.
24. Weber L.W., Boll M., Stämpfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 3081–3088.
25. Radhakrishnan A., Goldstein J.L., McDonald J.G., Brown M.S. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab.* 2008; 8: 512–521.
26. Leblond F., Seidah N.G., Precourt L.P. i wsp. Regulation of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in interstitial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 296: G805–G815.
27. Rashid S., Curtis D.E., Garuti R. i wsp. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 5374–5379.
28. Liang H., Chaparro-Riggers J., Strop P. i wsp. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antagonism reduces low-density lipoprotein cholesterol in statin-treated hypercholesterolemic nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012; 340: 228–236. doi: 10.1124/jpet.111.187419.
29. Zhang L., McCabe T., Condra J.H. i wsp. An anti-PCSK9 antibody reduces LDL-cholesterol on top of a statin and suppresses hepatocyte SREBP-regulated genes. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8: 310–327. doi: 10.7150/ijbs.3524.
30. Rashid S., Curtis D.E., Garuti R. i wsp. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 5374–5379.
31. Khovidhunkit W., Kim M.S., Memon R.A. i wsp. Effects of infection on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 2004; 45: 1169–1196.
32. Feingold K.R., Moser A.H., Shigenaga J.K. i wsp. Inflammation stimulates the expression of PCSK9. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2008; 374: 341–344.
33. Rader D.J., Cohen J., Hobbs H.H. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 1795–1803.
34. Ueda M. Familial hypercholesterolemia. *Mol. Genet. Metab.* 2005; 86: 423–426.
35. Moczulski D. Genetyka molekularna zaburzeń przemiany lipidów. W: Ciechanowicz A., Kokot F. (red.). Genetyka molekularna w chorobach wewnętrznych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009: 187–192.
36. Abifadel M., Varret M., Rabes J.P. i wsp. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 2003; 34: 154–156.
37. Alborn W.E., Cao G., Careskey H.E. i wsp. Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin. Chem.* 2007; 53: 1814–1819.
38. Duff C.J., Scott M.J., Kirby I.T. i wsp. Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor. *Biochem. J.* 2009; 419: 577–584. doi: 10.1042/BJ20082407.
39. Ni Y.G., Condra J.H., Orsatti L. i wsp. A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 12 882–12 891. doi: 10.1074/jbc.M110.113035.
40. Liang H., Chaparro-Riggers J., Strop P. i wsp. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 antagonism reduces low-density lipoprotein cholesterol in statin-treated hypercholesterolemic nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012; 340: 228–236. doi: 10.1124/jpet.111.187419.
41. Koren M.J., Giugliano R.P., Raal F.J. i wsp. Efficacy and safety of longer-term administration of evolocumab (AMG 145) in patients with hypercholesterolemia: 52-week results from the Open-Label Study of Long-Term Evaluation Against LDL-C (OSLER) randomized trial. *Circulation* 2014; 129: 234–243. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007012.
42. Stroes E., Colquhoun D., Sullivan D. i wsp. Anti-PCSK9 antibody effectively lowers cholesterol in patients with statin intolerance: the GAUSS-2 randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial of evolocumab. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63: 2541–2548. doi: 10.1016/j.jacc.2014.03.019.
43. Cho L., Rocco M., Colquhoun D. i wsp. Design and rationale of the GAUSS-2 study trial: a double-blind, ezetimibe-controlled phase 3 study of the efficacy and tolerability of evolocumab (AMG 145) in subjects with hypercholesterolemia who are intolerant of statin therapy. *Clin. Cardiol.* 2014; 37: 131–139. doi: 10.1002/clc.22248.
44. Koren M.J., Lundqvist P., Bolognese M. i wsp. Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia: the MENDEL-2 randomized, controlled phase III clinical trial of evolocumab. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63: 2531–2540. doi: 10.1016/j.jacc.2014.03.018.
45. McKenney J.M. i wsp. Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59: 2344–2353. doi: 10.1016/j.jacc.2012.03.007.
46. Roth E.M., McKenney J.M., Hanotin C. i wsp. Atorvastatin with or without an antibody to PCSK9 in primary hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367: 1891–1900.
47. Farnier M., Kastelein J.J.P., Roth E. i wsp. Relationship between alirocymab, PCSK9 and LDL-C levels: results from the ODYSSEY MONO phase 3 trial of alirocymab 75 mg every 2 weeks. Abstrakt EAS-0758. EAS, Madryt, 31 maja–3 czerwca 2014.
48. Christie M., Ballantyne C.M., Neutel J. i wsp. Efficacy and safety of bocicizumab (RN316/PF-04950615), a monoclonal antibody against pro protein convertase subtilisin/Kevin type 9 in statin-treated hypercholesterolemic subjects: results from a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study (NCT: 01592240). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 63 (12_S). doi:10.1016/S0735-1097(14)61374-7.
49. Majeed A., Schulman S. Bleeding and antidotes in new oral anticoagulants. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2013; 26: 191–202. doi: 10.1016/j.beha.2013.07.001.
50. Suryanarayan D., Schulman S. Potential antidotes for reversal of old and new oral anticoagulants. *Thromb. Res.* 2014; 133: S158–S166. doi: 10.1016/S0049-3848(14)50026-6.
51. Schiele F., van Ryn J., Canada K. i wsp. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization. *Blood* 2013; 121: 3554–3562.
52. Honickel M., Grottko O., Van Ryn J. i wsp. Use of a specific antidote to dabigatran (idarucizumab) reduces blood loss and mortality in dabigatran-induced and trauma-induced bleeding in pigs. *Crit. Care* 2014, 18 (supl. 1): P99. doi:10.1186/cc13289.
53. Van Ryn J., Litzemberger T., Waterman A. i wsp. Dabigatran anticoagulant activity is neutralized by an antibody selective to dabigatran in vitro and in vivo models. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57: 1130.
54. Glund S., Stangier J., Schmolh M. i wsp. A specific antidote for dabigatran: immediate, complete and sustained reversal of dabigatran induced anticoagulation in healthy male volunteers. American Heart Association Scientific Sessions, Dallas, Stany Zjednoczone, 16–20 listopada 2013 roku. Abstrakt 17 765.