



1. 血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂与血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂组合在制备用于治疗患有高脂血症的患者的药物中的用途;其中

所述ANGPTL8抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与ANGPTL8特异性结合并且包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的重链CDR1 (HCDR1),由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的HCDR2,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的HCDR3,由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的轻链CDR1 (LCDR1),由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的LCDR2和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的LCDR3;且

所述ANGPTL3抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与ANGPTL3特异性结合并且包含由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链CDR1 (HCDR1),由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的HCDR2,由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的HCDR3,由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链CDR1 (LCDR1),由SEQ ID NO:16的氨基酸组成的LCDR2和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的LCDR3。

2. 权利要求1的用途,其中高脂血症是家族性高脂血症或获得性高脂血症。

3. 权利要求1的用途,其中高脂血症选自高脂蛋白血症、高胆固醇血症、高甘油三酯血症和高乳糜微粒血症。

4. 权利要求2的用途,其中家族性高脂血症是高胆固醇血症,其选自杂合子家族性高胆固醇血症 (HeFH) 和纯合子家族性高胆固醇血症 (HoFH) 。

5. 权利要求2的用途,其中获得性高脂血症是过量饮酒、肥胖、药物副作用、糖尿病、肾病、甲状腺功能低下或妊娠的结果。

6. 权利要求5的用途,其中所述药物是激素或类固醇。

7. 权利要求1的用途,其中与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCVR。

8. 权利要求1-7中任一项的用途,其中将ANGPTL8抑制剂皮下或静脉内施用于患者。

9. 权利要求1的用途,其中ANGPTL3抗体是evinacumab。

10. 权利要求1的用途,其中与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCVR。

11. 权利要求1-7、9和10中任一项的用途,其中将ANGPTL3抗体或其抗原结合片段皮下或静脉内施用于患者。

12. 血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂与血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂组合在制备用于降低患有部分地表征为脂质或脂蛋白水平升高的病症或病况的患者中至少一种脂质参数水平的药物中的用途;其中

所述ANGPTL8抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与ANGPTL8特异性结合并且包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的重链CDR1 (HCDR1),由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的HCDR2,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的HCDR3,由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的轻链CDR1 (LCDR1),由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的LCDR2和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的LCDR3;且

所述ANGPTL3抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与ANGPTL3特异性结合并且包含由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链CDR1 (HCDR1),由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的HCDR2,由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的HCDR3,由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成

的轻链CDR1 (LCDR1) ,由SEQ ID NO:16的氨基酸组成的LCDR2和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的LCDR3。

13. 权利要求12的用途,其中所述病症或病况是选自由家族性高脂血症和获得性高脂血症组成的组的高脂血症。

14. 权利要求12的用途,其中所述病症或病况是选自高脂蛋白血症、高胆固醇血症、高甘油三酯血症和高乳糜微粒血症的高脂血症。

15. 权利要求13的用途,其中家族性高脂血症是高胆固醇血症,其选自杂合子家族性高胆固醇血症 (HeFH) 和纯合子家族性高胆固醇血症 (HoFH) 。

16. 权利要求13的用途,其中所述获得性高脂血症是过量饮酒、肥胖、药物副作用、糖尿病、肾病、甲状腺功能低下或妊娠的结果。

17. 权利要求16的用途,其中所述药物是激素或类固醇。

18. 权利要求12的用途,其中与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCVR。

19. 权利要求12至18中任一项的用途,其中将ANGPTL8抗体或其抗原结合片段皮下或静脉内施用于患者。

20. 权利要求12的用途,其中ANGPTL3抗体是evinacumab。

21. 权利要求12的用途,其中与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCVR。

22. 权利要求12-18、20和21中任一项的用途,其中将ANGPTL3抗体或其抗原结合片段皮下或静脉内施用于患者。

23. 权利要求1-7、9、10、12-18、20和21中任一项的用途,其中ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂同时或相继施用。

24. 权利要求1-7、9、10、12-18、20和21中任一项的用途,其中ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂以治疗有效浓度在分开的药物组合物中施用或共同配制在一种药物组合物中。

25. 一种用于治疗患有高脂血症的患者的药物组合物,其中所述组合物包含治疗有效量的血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂和血管生成素样蛋白3抑制剂 (ANGPTL3) 的组合;其中

所述ANGPTL8抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与ANGPTL8特异性结合并且包含由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的重链CDR1 (HCDR1) ,由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的HCDR2,由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的HCDR3,由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的轻链CDR1 (LCDR1) ,由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的LCDR2和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的LCDR3;且

所述ANGPTL3抑制剂是抗体或其抗原结合片段,其与ANGPTL3特异性结合并且包含由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的重链CDR1 (HCDR1) ,由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的HCDR2,由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的HCDR3,由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的轻链CDR1 (LCDR1) ,由SEQ ID NO:16的氨基酸组成的LCDR2和由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的LCDR3。

## 用ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂治疗高脂血症的方法

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已经通过电子方式以ASCII格式提交并因而通过引用方式完整并入的序列表。2017年4月7日创建的所述ASCII副本命名为 SequenceList\_25PCT.txt 并且大小为 18,447 比特。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及与脂质水平和脂蛋白水平升高相关的疾病和病症的治疗性疗法领域。更具体地，本发明涉及与血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂组合的血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂治疗患有高胆固醇血症及相关病症的患者的用途。

### 背景技术

[0004] 高脂血症是涵盖特征为血液中脂质水平和/或脂蛋白水平升高或与之相关的疾病和病症的一般术语。高脂血症包括高胆固醇血症、高甘油三酯血症、合并高脂血症和脂蛋白a (Lp (a)) 升高。在许多群体中，特定的高脂血症主流形式是高胆固醇血症。

[0005] 高胆固醇血症，尤其低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇 (LDL-C) 水平升高，构成形成动脉粥样硬化和冠状动脉心脏病 (CHD) 的主要风险 (Sharrett 等, 2001, Circulation 104: 1108-1113)。低密度脂蛋白胆固醇经鉴定为胆固醇降低疗法的主要靶并且公认为有效的代用治疗终点。众多研究已经显示，降低 LDL-C 水平减少 CHD 风险，在 LDL-C 水平和 CHD 事件之间存在强力直接关系；LDL-C 每降低 1mmol/L (约 40mg/dL)，则降低心血管疾病 (CVD) 死亡率和发病率 22%。LDL-C 降低越大引起各事件减少越多，并且强化他汀治疗与标准他汀治疗的对比数据表明，LDL-C 水平越低，面临极高心血管 (CV) 风险的患者中获益越大。

[0006] 家族性高胆固醇血症 (FH) 是脂质代谢遗传性病症使人们易患早发重度心血管疾病 (CVD) (Kolansky 等, (2008), Am J Cardiology, 102 (11) :1438-1443)。FH 可以是因低密度脂蛋白受体 (LDLR) 中或至少 3 个编码涉及肝脏清除 LDL-C 的蛋白质的不同基因中突变产生的常染色体显性或常染色体隐性疾病，所述突变可能造成 FH。这类缺陷的实例包括在编码从循环移走 LDL-C 的 LDL 受体 (LDLR) 的基因中和作为 LDL 粒子的主要蛋白质的载脂蛋白 (Apo) B 基因中的突变。在全部病例中，FH 特征如下：血浆中 LDL-C 从出生堆积及后续形成腱黄瘤、黄色斑、粥样斑和 CVD。根据个体是否在牵涉基因的一个 (杂合) 或两个 (纯合) 拷贝中具有遗传缺陷，FH 可以分为杂合 FH (heFH) 或纯合 FH (hoFH)。

[0007] 当前降低 LDL-C 的药物包括他汀类、胆固醇吸收抑制剂、贝特类、烟酸和胆汁酸螯合剂。他汀类是为降低 LDL-C 常开具的治疗。但是，尽管这类降脂疗法可用性，但许多高风险患者不能实现其指南目标 LDL-C 水平 (Gitt 等, 2010, Clin Res Cardiol 99 (11) :723-733)。对于仍不能实现指南目标 LDL-C 水平的患者，即便脂质调节疗法 (LMT) 可获得，但有时规定通过脂蛋白清血法 (例如，LDL 清血法) 机械移除 LDL-C。

[0008] 但是，尽管接受优化 LMT 方案但未实现 LDL-C 目标的患者将从备选性 LDL-C 降低疗法或通过使用治疗活性剂 (如本文所述活性剂和方案) 的组合而获益甚多。

[0009] 发明简述

[0010] 在第一方面,本发明提供了通过给予治疗有效量的血管生成素样蛋白 8抑制剂 (ANGPTL8) 联合治疗有效量的血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂来治疗患有高脂血症的患者的方法。

[0011] 在一个实施方案中,高脂血症是家族性高脂血症或获得性高脂血症。

[0012] 在一个实施方案中,高脂血症选自高脂蛋白血症,高胆固醇血症,高甘油三酯血症或高乳糜微粒血症。

[0013] 在一个实施方案中,家族性高脂血症是选自由杂合子家族性高胆固醇血症 (HeFH) 和纯合子家族性高胆固醇血症 (HoFH) 组成的组的高胆固醇血症。

[0014] 在一个实施方案中,获得性高脂血症是过量饮酒,肥胖,药物(例如激素或类固醇)副作用,糖尿病,肾病,甲状腺功能低下 (underactive thyroid gland) 或妊娠的结果。

[0015] 在一个实施方案中,ANGPTL8抑制剂是特异性结合ANGPTL8的抗体或其抗原结合片段。

[0016] 在一个实施方案中,与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR) 和SEQ ID NO:5的轻链可变区 (LCVR) 的CDR。

[0017] 在一个实施方案中,与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1 (HCDR1),具有 SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR2,具有 SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR3,具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR1 (LCDR1),具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0018] 在一个实施方案中,与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的LCVR。

[0019] 在一个实施方案中,ANGPTL8抗体皮下或静脉内施用于患者。

[0020] 在一个实施方案中,ANGPTL3抑制剂是与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0021] 在一个实施方案中,ANGPTL3抗体是evinacumab。

[0022] 在一个实施方案中,与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR) 和SEQ ID NO:14的轻链可变区 (LCVR) 的CDR。

[0023] 在一个实施方案中,与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链CDR1 (HCDR1),具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR2,具有 SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR3,具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链CDR1 (LCDR1),具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR2和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LCDR3。

[0024] 在一个实施方案中,与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的LCVR。

[0025] 在一个实施方案中,ANGPTL3抗体皮下或静脉内施用于患者。

[0026] 在第二方面,本发明提供降低患有部分表征为脂质或脂蛋白水平升高的病症或病况的患者中至少一种脂质参数水平的方法,该方法包括给予患者治疗有效量的血管生成素

样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂和血管生成素样蛋白3抑制剂 (ANGPTL3) 的组合。

[0027] 在一个实施方案中,所述病症或病况是选自由家族性高脂血症和获得性高脂血症组成的组的高脂血症。

[0028] 在一个实施方案中,所述病症或病况是选自高脂蛋白血症,高胆固醇血症,高甘油三酯血症或高乳糜微粒血症的高脂血症。

[0029] 在一个实施方案中,家族性高脂血症是选自由杂合子家族性高胆固醇血症 (HeFH) 和纯合子家族性高胆固醇血症 (HoFH) 组成的组的高胆固醇血症。

[0030] 在一个实施方案中,获得性高脂血症是过量饮酒,肥胖,药物(例如激素或类固醇)副作用,糖尿病,肾病,甲状腺功能低下或妊娠的结果。

[0031] 在一个实施方案中,可通过本发明的方法治疗的高甘油三酯血症包括家族性组合的高脂血症,家族性异常β脂蛋白血症,家族性高甘油三酯血症,严重的乳糜微粒血症和家族性脂蛋白脂肪酶缺乏症。

[0032] 在一个实施方案中,ANGPTL8抑制剂是特异性结合ANGPTL8的抗体或其抗原结合片段。

[0033] 在一个实施方案中,与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR) 和SEQ ID NO:5的轻链可变区 (LCVR) 的CDR。

[0034] 在一个实施方案中,与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1 (HCDR1),具有 SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HCDR2,具有 SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR3,具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR1 (LCDR1),具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的LCDR2,和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的LCDR3。

[0035] 在一个实施方案中,与ANGPTL8特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的LCVR。

[0036] 在一个实施方案中,ANGPTL8抗体皮下或静脉内施用于患者。

[0037] 在一个实施方案中,ANGPTL3抑制剂是与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0038] 在一个实施方案中,ANGPTL3抗体是evinacumab。

[0039] 在一个实施方案中,与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR) 的互补决定区 (CDR) 和SEQ ID NO:14的轻链可变区 (LCVR) 的CDR。

[0040] 在一个实施方案中,与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链CDR1 (HCDR1),具有 SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR2,具有 SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HCDR3,具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链CDR1 (LCDR1),具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR2,和具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的LCDR3。

[0041] 在一个实施方案中,与ANGPTL3特异性结合的抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO: 14的氨基酸序列的LCVR。

[0042] 在一个实施方案中,ANGPTL3抗体皮下或静脉内施用于患者。

[0043] 在一个实施方案中,ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂同时或相继施用。

[0044] 在一个实施方案中, ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂以治疗有效浓度在分开的药物组合物中施用或共同配制在一种药物组合物中。

[0045] 在第三方面,本发明提供用于治疗患者中高脂血症的方法,所述患者不响应于标准脂质调节疗法治疗、不充分受其控制或对其不耐受。本发明的治疗方法导致血清脂蛋白水平降至正常和可接受范围,并且本身可以起到降低形成动脉粥样硬化或冠状动脉心脏病之风险的作用。

[0046] 在一个实施方案,本发明提供一种治疗患有高胆固醇血症的患者的方法,其中患者不响应于标准脂质调节疗法治疗、不充分受其控制或对其不耐受,所述方法包括用血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂抑制剂和血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂的组合治疗患者。

[0047] 在一个实施方案中,本发明提供向正接受或已经用标准脂质调节疗法治疗、但尚未响应于这类疗法的患者施用与一剂或多剂ANGPTL3抑制剂组合的一剂或多剂ANGPTL8抑制剂。向患者施用ANGPTL8抑制剂与 ANGPTL3抑制剂的组合导致患者的血清中至少一种脂蛋白的水平降低并且因此减少或消除患者接受标准降脂疗法治疗的需要。

[0048] 在第四方面,本发明的方法包括选择正受到治疗或已经用标准降脂疗法治疗并且不响应于这类疗法、不充分受其控制或对其不耐受的高胆固醇血症患者,并且向患者施用与一剂或多剂ANGPTL3抗体组合的一剂或多剂ANGPTL8抗体,因而降低患者的血清中至少一种脂蛋白的水平并且因此将使用标准脂质调节疗法替换为ANGPTL8抗体加ANGPTL3抗体的组合疗法以实现目标脂蛋白水平。

[0049] 通过本发明方法治疗或可治疗的患者例如包括高胆固醇血症患者,包括家族性高胆固醇血症 (FH) 患者。在某些实施方案中,通过本发明方法治疗或可治疗的患者是这样的患者,他们经诊断患有(或否则已知患有)纯合 FH (hoFH) 或杂合FH (heFH) 或面临与纯合FH (hoFH) 或杂合FH (heFH) 相关的形成异常高的脂质水平和/或脂蛋白水平的风险。

[0050] 本发明还提供包含ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂的药物组合物,其用于治疗不响应于标准脂质调节疗法(如他汀)治疗、不充分受其控制或对其不耐受的患者。他汀可以选自阿托伐他汀 (**LIPITOR®**)、匹伐他汀 (**LIVALO®**)、洛伐他汀 (**MEVACOR®**)、辛伐他汀 (**ZOCOR®**)、普伐他汀 (**PRAVACHOL®**)、氟伐他汀 (**LESCOL®**) 和瑞舒伐他汀 (**CRESTOR®**)。可以在患有高胆固醇血症的患者中使用的其他标准降脂活性剂包括但不限于贝特类、烟酸、胆汁酸螯合剂、依折麦布 (ezetimibe) (**ZETIA®**)、洛美他派 (**JUXTAPID®**)、植物甾醇类、奥利司他 (**XENICAL®**)。

[0051] 可以在本发明方法的背景下使用的示例性ANGPTL8抑制剂或 ANGPTL3抑制剂例如包括抗ANGPTL8或抗ANGPTL3抗体、小分子抑制剂、和基于支架的分子,即ANGPTL8结合分子或ANGPTL3结合分子。

[0052] 在某些实施方案中,构思ANGPTL8抑制剂与ANGPTL3抑制剂组合的使用可能足以有效降低血清脂质和/或脂蛋白水平,从而可以减少标准脂质调节疗法的剂量,以消除任何不利作用,或可以完全消除它。

[0053] 在一个实施方案中,施用ANGPTL8抗体与ANGPTL3抗体的组合对降低甘油三酯和总胆固醇的血液水平产生加合影响。

[0054] 在一个实施方案中,施用ANGPTL8抗体与ANGPTL3抗体的组合对降低甘油三酯和总

胆固醇的血液水平产生协同影响。

[0055] 在一个实施方案中,施用ANGPTL8抗体与ANGPTL3抗体的组合导致以下一个或多个参数降低:

[0056] (a) 血清总胆固醇 (TC) 水平降低;或

[0057] (b) 血清甘油三酯 (TG) 降低;

[0058] 其中在开始用ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂的组合治疗之前或之时,相对于患者的血清TC水平或血清甘油三酯水平,确定(a) 和/ 或 (b) 降低。

[0059] 在另外的不同方面,本发明涉及血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂联合血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂在治疗患有高脂血症的患者中的用途;本发明涉及血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂联合血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂在制备用于治疗患有高脂血症的患者的药物中的用途;并且本发明涉及用于治疗患有高脂血症的患者的药物组合物,其中所述组合物包含治疗有效量的血管生成素样蛋白8 (ANGPTL8) 抑制剂和血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3) 抑制剂的组合。通过阅读随后的详细描述,本发明的其他实施方案将变得显而易见。

## 附图说明

[0060] 图1显示在给药后第2天或第8天,抗ANGPTL3抗体H4H1276S (也称为evinacumab) 对ANGPTL8敲除 (KO) 小鼠或野生型 (WT) 小鼠中甘油三酯水平的影响。

[0061] 图2显示在给药后第2天或第8天,H4H1276S对ANGPTL8敲除小鼠或野生型小鼠中总胆固醇水平的影响。

[0062] 图3显示在给药后第1、4、7和14天,人源化ANGPTL8小鼠中 H4H1276S和H4H15341P (也称为“H4H15341”,抗ANGPTL8抗体) 对甘油三酯水平的影响。

[0063] 图4显示在施用后第1、4、7和14天,人源化ANGPTL8小鼠中 H4H1276S和H4H15341P (抗ANGPTL8抗体) 对总胆固醇水平的影响。

[0064] 图5显示抗ANGPTL8单克隆抗体表位作图的结果:进行PEPSCAN ELISA以检查抗ANGPTL8抗体与跨越成熟ANGPTL8的15个氨基酸长肽的结合,具有14个氨基酸重叠。

[0065] 图6a,6b,6c,6d,6e和6f显示ANGPTL8抗体通过LPL与ANGPTL8 抑制基序的空间干扰逆转ANGPTL3:ANGPTL8介导的LPL抑制。(图 6a) 描绘了针对人ANGPTL8产生的八种单克隆抗体的表位的ANGPTL8 氨基酸序列 (SEQ ID NO:19)。(图6b) 单次注射10mg/ml八种具有(图6a) 示出的表位的单克隆抗体7天前(采血前)和2天后,人源化 ANGPTL8小鼠的血清甘油三酯。(图6c) 用增加浓度的抗ANGPTL8阻断抗体 (mAb7) 或对照抗体处理来自用ANGPTL3和ANGPTL8共转染的HEK283T细胞的细胞培养基中测量的LPL活性。(图6d) 用于确定在CHO-K1细胞中共表达的ANGPTL3和ANGPTL8之间的相互作用的 AlphaLISA测定,其中没有或增加浓度的抗ANGPTL8阻断抗体 (mAb7) 或对照抗体。(图6e) 用在ANGPTL8的N-末端、接近其抑制基序的供体染料和用受体染料标记的阻断和非阻断抗体的TR-FRET测定的方案。(图6f) 通过TR-FRET测定在N-末端标记的ANGPTL8和对照抗体,抗 ANGPTL8阻断抗体 (mAb7) 或非阻断性抗ANGPTL8 (mAb4) 之间测量的能量转移 (n=3; \* \* \* p<0.0001)。实验重复3次,结果相似。缩写: Bio,生物素; SA,链霉亲和素, mAb,单克隆抗体,; D,供体染料; A,受体染料。

[0066] 发明详述

[0067] 在描述本发明之前,应该理解本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为这样的方法和条件可以变化。还应该理解的是,文中使用的术语仅仅是为了描述特定实施方案的目的,而不是为了限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求来限制。

[0068] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如本文所使用的,术语“约”在用于提及特定的所述数值时意指该值可以不超过1%地与所述值不同。例如,如在此使用的,表述“约100”包括99和101以及之间的所有值(例如 99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0069] 虽然在本发明的实施中可以使用与本文中所述相似或等价的任何方法和材料,现在描述了优选的方法和材料。本文中提到的全部出版物均通过描述其完整性的引用方式并入本文。

[0070] 用于治疗高脂血症的方法

[0071] 本发明大体涉及通过向需要这样的疗法的患者施用ANGPTL8抑制剂与ANGPTL3抑制剂的组合来降低患有高脂血症的患者中的脂蛋白水平,特别是甘油三酯和总胆固醇的方法和组合物。在某些实施方案中,抑制剂的组合用于治疗对标准脂质修饰疗法(例如他汀类药物)无反应、不充分受控或不耐受的患者的高胆固醇血症或高甘油三酯血症。在本发明的某些实施方案中,用ANGPTL8抑制剂联合ANGPTL3抑制剂治疗可用作将这些患者中的脂蛋白水平降低至可接受的范围,从而降低其发展动脉粥样硬化、中风和其他心血管疾病的风险。在某些实施方案中,所述方法可用于治疗患有高胆固醇血症的患者,所述高胆固醇血症包括杂合子家族性高胆固醇血症 (heFH) 和/或纯合子家族性高胆固醇血症 (hoFH),如果这些患者对标准的脂质修饰疗法没有反应、不充分受控制或不耐受的话。在某些实施方案中,所述方法可用于治疗患有动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、糖尿病、肥胖症、胰腺炎或代谢综合征的患者或有患病风险的患者。

[0072] 如本文所用,术语“脂蛋白”意指同时含有蛋白质和脂质的生物分子粒子。脂蛋白的实例例如包括低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL)、极低密度脂蛋白 (VLDL)、中等密度脂蛋白 (IDL) 和脂蛋白 (a) (Lp (a))。

[0073] 根据某些实施方案,本发明包括用于治疗不响应于标准脂质调节疗法、不充分受其控制或对其不耐受的患者的方法。如本文所用,“不响应于标准脂质调节疗法、不充分受其控制或对其不耐受”的具体患者由医师、医师的助手、诊断医师或其他医学从业人员,基于标准脂质调节活性剂治疗后患者血清中所测量或另外检出的一种或多种脂蛋白(例如,LDL-C和/或非 HDL-C)的水平确定。基于标准脂质调节疗法的副作用谱,医师、医师的助手、诊断医师或其他医学从业人员还可以确定患者是否对标准脂质调节疗法不耐受,其中所述患者可以体验到所述副作用,包括但不限于肌肉痛、触痛或虚弱(肌痛)、头痛、皮肤潮红、睡眠困难、腹部绞痛、胃胀气、腹泻、便秘、皮疹、恶心或呕吐。不响应于标准脂质调节疗法、不充分受其控制或对其不耐受的患者也可以依据其他因素如患者的家族史、医疗背景、当前治疗性疗法状态以及国家医学学会和医师团体采纳的普遍接受或主流的脂蛋白目标来确定或受其影响。例如,在某些情况下,如果患者正在接受标准脂质调节活性剂疗法,并且显示大于或等于约70mg/dL的LDL-C 水平,则这表示该患者“不响应于标准脂质调节疗法或不充分受其控制或对其不耐受”并且可以通过使用本文所述疗法的治疗而得益。在其他情况下,如果患者正在接受标准脂质调节活性剂疗法,并且显示大于或等于约100 mg/dL的LDL-

C水平,则这表示该患者“不响应于标准脂质调节疗法、不充分受其控制或对其不耐受”并且可以通过使用本文所述疗法的治疗而得益。在某些情况下,如果患者正在接受标准脂质调节活性剂疗法,并且显示大于或等于约150mg/dL、200mg/dL、250mg/dL、300mg/dL、400mg/dL或更高的LDL-C水平,则这表示该患者“不响应于标准脂质调节疗法、不充分受其控制或对其不耐受”并且可以通过使用本文所述疗法的治疗而得益。在另外的情况下,相对于患者在特定起始(“基线”)的LDL-C或非HDL-C水平是否达到LDL-C或非HDL-C水平的特定百分数降低,可以用来确定患者是否已经响应于标准脂质调节疗法或患者是否需要使用本发明方法和活性剂的其他治疗。例如,LDL-C或非HDL-C距基线降低小于50%(例如,小于40%、小于35%、小于30%、小于25%等)可以预示需要使用本发明方法和活性剂的疗法。

[0074] 例如,在某些情况下,如果患者正在接受标准脂质修饰剂疗法,并且表现出甘油三酯(TG)水平大于或等于约150mg/dL,这表明患者是“对标准脂质修饰疗法无反应或不充分受控或不耐受”并且可通过使用本文所述疗法的治疗而受益。在其他情况下,如果患者正在接受标准脂质修饰剂疗法,且表现出TG水平大于或等于约200mg/dL,这表明患者“对标准的脂质修饰疗法无反应、不充分受控或者不耐受”,并且可以通过使用本文描述的疗法的治疗而受益。在某些情况下,如果患者正在接受标准脂质修饰剂疗法,并且表现出TG水平大于或等于约300mg/dL,400mg/dL,500mg/dL,750mg/dL,1000mg/dL或更高,这表明患者“对标准脂质修饰疗法无反应、不充分受控或不耐受”,并且可通过使用本文所述疗法的治疗而受益。

[0075] 在其他情况下,相对于在特定起始点(“基线”)患者的TG,TC,LDL-C或非HDL-C的水平,是否满足TG,TC,LDL-C或非HDL-C水平的特定百分比降低可用于确定患者是否对标准脂质修饰疗法有反应或者该患者是否需要使用本发明的方法和活性剂进一步治疗。例如,TG,TC,LDL-C或非HDL-C从基线的降低小于50%(例如,小于40%,小于35%,小于30%,小于25%等)可能意味着需要使用本发明的方法和活性剂的疗法。

[0076] 因此,本发明包括这样的治疗方法,所述治疗方法包括向患者施用与一剂或多剂ANGPTL3抑制剂组合的一剂或多剂ANGPTL8抑制剂,而患者的治疗后总胆固醇、TG、LDL-C和/或非HDL-C水平在数值上显著降低。例如,本发明包括这样的治疗方法,所述治疗方法包括向患者施用一剂或多剂ANGPTL8抑制剂和一剂或多剂ANGPTL3抑制剂,所述患者正在接受标准脂质调节疗法,但不响应于这种疗法,或对这种疗法不耐受,其中,在接受一剂或多剂ANGPTL8抑制剂和一剂或多剂ANGPTL3抑制剂后,患者能够实现正常的总胆固醇、TG、LDL-C或非LDL-C水平。在某些情况下,该患者可以脱离标准脂质调节疗法,或标准脂质调节疗法可以续用,但可以按较低剂量施用并且可以与ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂组合使用,以实现和/或维持特定的目标脂蛋白水平。备选地,可以按正常的开具剂量向患者施用标准脂质调节疗法,但是如果标准脂质调节疗法将要与ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂的组合一起施用,则可以降低施用脂质调节疗法的频率。在一些情况下,在联合ANGPTL3抑制剂施用一剂或多剂ANGPTL8抑制剂后,可以完全消除患者为实现和/或维持特定目标脂蛋白水平而对标准脂质调节疗法治疗的需求。

[0077] 根据某些实施方案,本发明包括用于减少或消除标准脂质调节疗法需求的方法,其中所述方法包括选择在上个月、最近2个月、最近3个月、最近4个月、最近5个月、最近6个月或更长时间内已经用脂质调节疗法治疗过的高脂血症(例如,高胆固醇血症或高甘油三

酯血症)患者和向患者施用一剂或多剂与ANGPTL3抑制剂组合的ANGPTL8抑制剂。根据本发明的这个方面,所述方法导致患者的血清中至少一种脂蛋白的水平降低并且因此允许减少或消除患者对标准脂质调节疗法治疗的需要。例如,在本发明的某些实施方案中,在施用一剂或多剂与ANGPTL3抑制剂组合的ANGPTL8抑制剂后,患者的血清LDL-C的水平降至小于规定的水平(例如,小于100mg/dL或小于70mg/dL),或总胆固醇降至规定的水平(例如小于200mg/dL或小于150mg/dL)或TG水平降至规定的水平(例如小于200mg/dL,或小于150mg/dL)。

[0078] 根据某些实施方案,通过本发明方法可治疗的患者患有高胆固醇血症(例如,血清LDL-C浓度大于或等于70mg/dL,或血清LDL-C浓度大于或等于100mg/dL)。根据某些实施方案,可通过本发明的方法治疗的患者具有高甘油三酯血症(例如,血清TG浓度大于或等于150mg/dL,或血清TG浓度大于或等于200mg/dL)。在某些实施方案中,患者的高胆固醇血症不充分受标准脂质调节疗法(例如他汀疗法)控制。例如,本发明包括用于治疗患者的方法,所述患者不响应于标准脂质调节疗法(如他汀)治疗、不充分受其控制或对其不耐受,或患有不充分受每日他汀给药控制的高胆固醇血症,所述他汀选自阿托伐他汀(包括阿托伐他汀+依折麦布(ezetimibe))、瑞舒伐他汀、西立伐他汀(cerivastatin)、匹伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀(包括辛伐他汀+依折麦布(ezetimibe))、普伐他汀及其组合。本发明还包括用于减少患者中胆固醇,TG,LDL-C,或非LDL-C的方法,所述患者患有高胆固醇血症或高甘油三酯血症并且显示不耐受他汀或否则出现他汀疗法不良或不利反应(例如,骨骼肌疼痛、痛(ache)、虚弱或绞痛[例如,肌痛、肌病、横纹肌溶解等])。

[0079] 患者选择

[0080] 本发明包括可用于治疗患者的方法和组合物,其中所述患者患有高脂血症,不响应于标准脂质调节疗法治疗、不充分受其控制或对其不耐受。通过本发明方法可治疗的患者还可以显示出一个或多个额外的选择标准。例如,如果患者经诊断患有高胆固醇血症病况或经鉴定面临形成高胆固醇血症病况的风险,所述高胆固醇血症病状例如是杂合家族性高胆固醇血症(heFH)、纯合家族性高胆固醇血症(hoFH)、常染色体显性高胆固醇血症,常染色体隐性高胆固醇血症(ARH,例如,与LDLRAP1中突变相关的ARH),以及异于家族性高胆固醇血症的高胆固醇血症(非FH)的发生率,则可以选择患者用于本发明的方法治疗。可以依据基因分型和/或临床标准作出家族性高胆固醇血症(例如,heFH或hoFH)的诊断。对于未进行基因分型的患者,临床诊断可以基于Simon Broome标准联合确定性FH的标准,或WHO/Dutch脂质网络标准联合>8分的评分。

[0081] 根据某些实施方案,可以基于具有冠状动脉心脏病(CHD)史,选择患者。如本文所用“CHD史”(或“记录的CHD史”)包括以下一者或多者:(i)急性心肌梗死(MI);(ii)沉默型MI;(iii)不稳定型心绞痛;(iv)冠状动脉血管再生术(例如,经皮冠状动脉干预治疗[PCI]或冠状动脉旁路移植手术[CABG]);和/或(v)依据侵入型或非侵入型检验(如冠脉血管造影术、使用踏车的负荷试验、负荷超声心动图术或核成像术)诊断的有临床意义的CHD。

[0082] 根据某些实施方案,可以基于具有非冠状动脉心脏病心血管疾病(“非CHD CVD”),选择患者。如本文所用,“非CHD CVD”包括以下一者或多者:(i)记录的既往缺血性中风伴随迁延超过24小时的视为动脉粥样化血栓形成源性的局灶性缺血性神经系统功能缺损;(ii)外周动脉病;(iii)腹主动脉瘤;(iv)动脉粥样硬化性肾动脉狭窄;和/或(v)颈动脉

病(一过性缺血发作或颈动脉阻塞>50%)。

[0083] 根据某些实施方案,患者可以基于具有以下一个或多个附加风险因素来选择,如,例如, (i) 记录的如 $30 \leq eGFR < 60 \text{mL/分钟}/1.73\text{m}^2$ 持续3个月或更长所定义的中等慢性肾脏病(CKD); (ii) 伴随或未伴有靶器官损伤(例如,视网膜病变、肾病、微量白蛋白尿)的1型或2型糖尿病; (iii) 计算的 10年致命性CVD风险评分 $\geq 5\%$  (ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidemias, Conroy等人, 2003, Eur. Heart J. 24: 987-1003)。

[0084] 根据某些实施方案,患者可以基于具有选自以下的一个或多个附加风险因素来选择: 年龄(例如,年龄超过40、45、50、55、60、65、70、75 或80岁)、人种、国籍、性别(男性或女性)、锻炼习惯(例如,定期锻炼者、从不锻炼者)、其他预存医学病状(例如,II型糖尿病、高血压等) 和当前用药状态(例如,目前正在服用β阻滞剂、烟酸、依折麦布(ezetimibe)、贝特类、 $\omega$ -3脂肪酸、胆汁酸树脂等)。

[0085] 根据本发明的某些实施方案,通过本发明方法可治疗的受试者显示升高水平的一种或多种炎症标志物。可以出于本发明目的,利用全身性炎症的任何标志物。合适的炎症标志物包括而不限于C-反应蛋白、细胞因子(例如,IL-6、IL-8、和/或IL-17) 和细胞黏附分子(例如,ICAM-1、ICAM-3、BL-CAM、LFA-2、VCAM-1、NCAM和PECAM)。

[0086] 根据本发明,患者可以基于一个或多个前述选择标准或治疗性特征的组合来选择。例如,根据某些实施方案,适于本发明方法治疗的患者还可以基于患有heFH或非FH结合以下项来选择: (i) 记录的CHD史, (ii) 非 CHD CVD, 和/或 (iii) 糖尿病伴随靶器官损伤; 这类患者也可以基于具有大于或等于70mg/dL的血清LDL-C浓度来选择。

[0087] 根据某些其他实施方案,除患有未充分受每日中等剂量治疗性他汀方案控制的高胆固醇血症之外,适于用本发明方法治疗的患者还可以基于以下来选择: 患有heFH或非FH未伴有CHD, 或患有非CHD CVD, 但是具有 (i)  $\geq 5\%$  的计算的10年致命性CVD风险评分; 或 (ii) 糖尿病未伴有靶器官损伤; 这类患者也可以基于具有大于或等于100mg/dL的血清LDL-C 浓度来选择。

[0088] 根据本发明的某些实施方案,通过本发明方法可治疗的受试者是患有家族性乳糜微粒血症综合征(FCS; 也称作脂蛋白脂酶缺乏症)的受试者。

[0089] 根据本发明的某些实施方案,通过本发明方法可治疗的受试者是正在接受或(例如,在最近六个月以内、最近12周以内、最近8周以内、最近6 周以内、最近4周以内、最近2周以内等)曾接受过脂蛋白清血法的受试者。

[0090] 施用ANGPTL8抑制剂加ANGPTL3抑制剂作为添加疗法

[0091] 本发明包括治疗方法,其中根据特定给药量和频率,向正在接受或最近已经接受过标准脂质调节疗法(例如他汀)的患者施用ANGPTL8抑制剂加ANGPTL3抑制剂,并且其中ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂作为患者预存脂质调节疗法(如果适用)的附加(如患者预存每日治疗性他汀方案的附加)施用。

[0092] 例如,本发明的方法包括附加治疗方案,其中ANGPTL8抑制剂和 ANGPTL3抑制剂作为患者接受ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂之前正在接受的同一个稳定每日治疗性他汀方案的附加疗法施用(即,相同给药量的他汀)。在其他实施方案中,ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂作为治疗性他汀方案的附加疗法施用,所述治疗性他汀方案包含的他汀量多于或少于患者接受ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂之前正在接受的他汀剂量。例如,在

启动包含按特定给药频率和给药量施用的ANGPTL8 抑制剂和ANGPTL3抑制剂的治疗方案后,根据患者的治疗需要,与启动 ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂治疗方案之前患者正在服用的每日他汀剂量相比,向患者施用或开具的每日他汀剂量可以 (a) 保持相同、(b) 增加或 (c) 减少(例如,上调或下调)。

[0093] 疗效

[0094] 本发明的方法可以导致选自总胆固醇、LDL-C、非HDL-C、ApoB100、VLDL-C、甘油三酯(TG)、Lp (a) 和残余胆固醇的一种或多种脂质组分的血清水平降低。例如,根据本发明的某些实施方案,向合适的受试者施用与 ANGPTL3抑制剂组合的ANGPTL8抑制剂将导致至少约25%、30%、40%、50%、60%或更大的血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)距基线平均降低百分数;至少约25%、30%、40%、50%、60%或更大的ApoB100 距基线平均降低百分数;至少约25%、30%、40%、50%、60%或更大的非HDL-C距基线平均降低百分数;至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%或更大的总胆固醇距基线平均降低百分数;至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%或更大的VLDL-C距基线平均降低百分数;至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或更大的甘油三酯距基线平均降低百分数;和/或至少约5%、10%、15%、20%、25%或更大的Lp (a) 距基线平均降低百分数。

[0095] ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂

[0096] 本发明的方法包括向患者施用包含ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂的治疗性组合物。

[0097] ANGPTL8抑制剂

[0098] 如本文所用,“ANGPTL8抑制剂”是在体外或体内与人ANGPTL8结合或相互作用并且抑制ANGPTL8的正常生物学功能的任何物质。ANGPTL8抑制剂类别的非限制性实例包括小分子ANGPTL8拮抗剂、基于核酸的ANGPTL8表达或活性抑制剂(例如,siRNA或反义)、基于肽的与ANGPTL8特异性相互作用的分子(例如,肽体(peptibody))、与 ANGPTL8特异性相互作用的受体分子、包含LDL受体的配体结合部分的蛋白质、结合ANGPTL8的支架分子(例如, DARP in、HEAT 重复序列蛋白, ARM 重复序列蛋白、三角形四肽重复序列蛋白(tetratricopeptide repeat proteins)、基于纤连蛋白的支架构建体和其他基于天然存在性重复序列蛋白的支架等[参见,例如.,Boersma和Pluckthun,2011,Curr.Opin.Biotechnol.22:849-857,及其中引用的参考文献])和抗ANGPTL8适配体或其部分。根据某些实施方案,可以在本发明背景下使用的ANGPTL8抑制剂是特异性结合人ANGPTL8的抗ANGPTL8抗体或抗原结合片段抗体。

[0099] 术语“人血管生成素样蛋白8”或“人ANGPTL8”或“hANGPTL8”或“ANGPTL8”也称为“lipasin”,“RIFL”或“betatrophin”。人ANGPTL8还指具有SEQ ID NO:9的氨基酸1-177中所示的蛋白质序列的ANGPTL8,或其生物活性片段,以及GenBank登录号NP\_061157.3 (SEQ ID NO:19) 中所示的蛋白质序列。可通过本发明的抗体或其抗原结合片段中和,抑制,阻断,消除,减少或干扰的ANGPTL8的活性包括但不限于抑制LPL活性或降低体内甘油三酯水平等。

[0100] ANGPTL3抑制剂

[0101] 如本文所用,“ANGPTL3抑制剂”是在体外或体内与人ANGPTL3结合或相互作用并且抑制ANGPTL3的正常生物学功能的任何物质。ANGPTL3抑制剂类别的非限制性实例包括小分子ANGPTL3拮抗剂、基于核酸的ANGPTL3表达或活性抑制剂(例如,siRNA或反义)、基于肽

的与ANGPTL3特异性相互作用的分子(例如,肽体(peptibody))、与ANGPTL3特异性相互作用的受体分子、结合ANGPTL3的支架分子(例如, DARPin、HEAT重复序列蛋白, ARM重复序列蛋白、三角形四肽重复序列蛋白(tetratricopeptide repeat proteins)、基于纤连蛋白的支架构建体和其他基于天然存在性重复序列蛋白的支架等[参见,例如., Boersma和Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotechnol. 22:849-857, 及其中引用的参考文献])和抗ANGPTL3适配体或其部分。根据某些实施方案,可以在本发明背景下使用的ANGPTL3抑制剂是特异性结合人ANGPTL3的抗ANGPTL3抗体或抗体的抗原结合片段。

[0102] 如本文所用,术语“人血管生成素样蛋白-3”或“人ANGPTL3”或“hANGPTL3”,指具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的ANGPTL3(还参见 NCBI 登录号NP\_055310)或其生物活性片段。

[0103] 如本文所用的,术语“抗体”意图是指免疫球蛋白分子以及其多聚体(例如IgM),所述免疫球蛋白分子包含通过二硫键相互连接的四条多肽链、两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或V<sub>H</sub>)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2和C<sub>H</sub>3。每条轻链包含轻链可变区(本文中缩写为LCVR或V<sub>L</sub>)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(C<sub>L</sub>1)。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区可以进一步细分成称为互补决定区(CDR)的高变区,其中散布有较保守的区,称为框架区(FR)。每个V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中,抗ANGPTL3抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人种系序列相同,或者可以天然或人工修饰。可以基于两个或更多个CDR的并排分析定义氨基酸共有序列。

[0104] 如本文所用,术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等等包括任何天然存在的、酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白,其特异性结合抗原以形成复合物。使用任何合适的标准技术如蛋白水解消化或重组基因工程技术,包括操作和表达编码抗体可变和任选恒定结构域的DNA,抗体的抗原结合片段可以来源于例如完整抗体分子。这样的DNA是已知的和/或容易从例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体抗体文库)获得,或者可以合成。可以对DNA进行测序,并且化学地或通过使用分子生物学技术操作,例如,将一个或多个可变和/或恒定结构域排列成合适的构型、或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等等。

[0105] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 最小识别单元,其由模拟抗体高变区的氨基酸残基(例如分离的互补决定区(CDR),如CDR3肽)或限制性FR3-CDR3-FR4肽组成。其他工程化的分子,如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失的抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小的模块化免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域,也包括在本文所用的表述“抗原结合片段”内。

[0106] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。可变结构域可以是任何大小或氨基酸组成,并且通常将包含至少一个CDR,其与一个或多个框架序列相邻或在相同阅读框内(in frame)。在具有V<sub>H</sub>结构域和相关的V<sub>L</sub>结构域的抗原结合片段中,V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域可以以任何合适的排列相对于彼此进行定位。例如,可变区可以是二聚体并含有V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>或V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可含有单体V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>结构域。

[0107] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可以在本发明抗体的抗原结合片段内发现的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括: (i)  $V_H$ - $C_H$ 1; (ii)  $V_H$ - $C_H$ 2; (iii)  $V_H$ - $C_H$ 3; (iv)  $V_H$ - $C_H$ 1- $C_H$ 2; (v)  $V_H$ - $C_H$ 1- $C_H$ 2- $C_H$ 3; (vi)  $V_H$ - $C_H$ 2- $C_H$ 3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix)  $V_L$ - $C_H$ 2; (x)  $V_L$ - $C_H$ 3; (xi)  $V_L$ - $C_H$ 1- $C_H$ 2; (xii)  $V_L$ - $C_H$ 1- $C_H$ 2- $C_H$ 3; (xiii)  $V_L$ - $C_H$ 2- $C_H$ 3; 和 (xiv)  $V_L$ - $C_L$ 。在包括上面列出的任何示例性构型的可变结构域和恒定结构域的任何构型中,可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可由至少2个(例如5、10、15、20、40、60个或更多个)氨基酸组成,其导致在单个多肽分子中相邻可变和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,本发明抗体的抗原结合片段可以包含上面列出的任何可变和恒定结构域构型的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体),彼此非共价(例如通过二硫键)结合和/或与一个或多个单体VH或VL结构域非共价(例如通过二硫键)结合。

[0108] 与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常将包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够特异性结合单独的抗原或在相同抗原上结合不同的表位。使用本领域可用的常规技术,任何多特异性抗体形式,包括本文公开的示例性双特异性抗体形式可以适用于本发明抗体的抗原结合片段的上下文中。

[0109] 抗体的恒定区在抗体固定补体和介导细胞依赖的细胞毒性的能力中重要。因此,抗体的同种型可以基于抗体是否需要它介导细胞毒性来选择。

[0110] 如本文所用,术语“人抗体”意在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。然而,本发明的人抗体可以包括,例如在CDR 和尤其CDR3中包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变)。然而,如本文所用,术语“人抗体”不意在包括其中已经将从另一个哺乳动物物种(如小鼠)的种系衍生的CDR序列移植到人构架序列上的抗体。该术语包括在非人类哺乳动物中或非人类哺乳动物的细胞中重组产生的抗体。该术语不意在包括从人类受试者分离或在其中生成的抗体。

[0111] 如本文所用,术语“重组人抗体”旨在包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如使用转染至宿主细胞的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述)、从重组、组合人抗体文库中分离的抗体(下文进一步描述)、从人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如小鼠)中分离的抗体(参见例如Taylor等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)、或通过任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体,所述任何其他手段包括将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列。此类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,体外诱变这样的重组人抗体(或者当使用人Ig序列转基因的动物时,体内体细胞诱变),因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是这样的序列,其虽然来自人种系 $V_H$ 和 $V_L$ 序列并且与人种系 $V_H$ 和 $V_L$ 序列相关,但可能不是人抗体种系库内在体内天然存在的序列。

[0112] 人抗体可以按照与铰链异质性相关的两种形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包含约150-160kDa的稳定的四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键连接在一起。在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,其是由共价偶联的轻链和重链组成的约75-80kDa的分子(半抗体)。甚至在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。

[0113] 多种完整IgG同种型中出现第二形式的频率归因于,但不限于与抗体的铰链区同种型相关的结构性差异。人IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可以将第二种形式 (Angal等人 (1993) *Molecular Immunology* 30:105) 的出现显著降低至通常使用人IgG1铰链观察到的水平。本发明包括在铰链、C<sub>H</sub>2或C<sub>H</sub>3区具有一个或多个突变的抗体,例如,期望其在生产中改善所需抗体形式的产量。

[0114] 本文使用的“分离的抗体”是指已经鉴定并从其天然环境的至少一种组分中分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分或从天然存在抗体或天然产生抗体的组织或细胞中分离或移出的抗体,是本发明目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内原位的抗体。分离的抗体是经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0115] 术语“特异性结合”等意指抗体或其抗原结合片段与生理条件下相对稳定的抗原形成复合物。用于确定抗体是否与抗原特异性结合的方法是本领域熟知的并且例如包括平衡透析法、表面等离子体共振法等。例如,如本发明背景下所用,“特异性结合”ANGPTL8或“特异性结合”ANGPTL3的抗体包括如表面等离子体共振测定法中测量,以小于约1000nM、小于约500nM、小于约300nM、小于约200nM、小于约100nM、小于约90nM、小于约80nM、小于约70nM、小于约60nM、小于约50nM、小于约40 nM、小于约30nM、小于约20nM、小于约10nM、小于约5nM、小于约4nM、小于约3nM、小于约2nM、小于约1nM或少于约0.5nM的 K<sub>D</sub>结合ANGPTL8或ANGPTL3或其部分的抗体。然而,特异性结合人ANGPTL8或人ANGPTL3的分离的抗体对来自其他(非人)物种的其他抗原(如ANGPTL8分子或ANGPTL3分子)具有交叉反应性。

[0116] 如与衍生抗体的相应种系序列相比,可用于本发明方法的抗ANGPTL8和抗ANGPTL3抗体可以在重链可变结构域和轻链可变结构域的框架区和/或CDR区包含一个或多个氨基酸置换、插入和/或缺失。可以通过比较本文公开的氨基酸序列与例如从抗体序列公共数据库可获得的种系序列,容易地确定这类突变。本发明包括涉及抗体及其抗原结合片段的用途的方法,所述抗体及其抗原结合片段从本文公开的任一个氨基酸序列衍生,其中一个或多个框架区和/或CDR区内部的一个或多个氨基酸突变成衍生抗体的种系序列的相应残基,或突变成另一个人类种系序列的相应残基,或突变成相应种系残基的保守性氨基酸置换(这类序列变化在本文统称为“种系突变”)。始于本文公开的重链可变区序列和轻链可变区序列,本领域普通技术人员可以容易地产生包含一个或多个独立种系突变或其组合的众多抗体和抗原结合片段。在某些实施方案中,V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>结构域内部的全部构架残基和/或CDR残基均回复突变成衍生所述抗体的原始种系序列中存在的残基。在其他实施方案中,仅某些残基回复突变成原始种系序列,例如,突变的残基仅存在于FR1的前8个氨基酸内或FR4的最后8个氨基酸内或突变的残基仅存在于CDR1、CDR2或CDR3内。在其他实施方案中,一个或多个构架和/或CDR残基突变成不同种系序列(即,与最初衍生抗体的种系序列不同的种系序列)的相应残基。另外,本发明的抗体可以在框架区和/或CDR区内部含有两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些独立残基突变成特定种系序列的相应残基,而与最初种系序列不同的某些其他残基维持或突变成不同种系序列的相应残基。一旦获得,则可以对含有一个或多个种系突变的抗体和抗原结合片段容易地测试一种或多种所需特性,如,改善的结合特异性,增加的结合亲和力、改善或增强的拮抗性或激动性生物学特性(根据具体情况而定)、降低的免疫原性等。本发明内部涵盖以这种一般方式获得的抗体和抗原

结合片段的用途。

[0117] 本发明还包括涉及抗ANGPTL8和抗ANGPTL3抗体的用途的方法,所述抗体包含本文公开的具有一个或多个保守性置换的HCVR、LCVR和 /或CDR氨基酸序列中任一者的变体。例如,本发明包括具有HCVR、LCVR 和/或CDR氨基酸序列的抗ANGPTL8和抗ANGPTL3抗体的用途,相对于本文公开的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列中任一者,所述氨基酸序列例如具有10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守性氨基酸置换。

[0118] 如本文所用,术语“表面等离子体共振”指允许例如使用BIAcore<sup>TM</sup>系统(Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ),通过检测生物传感器基质内部蛋白质浓度的改变来分析实时相互作用的光学现象。

[0119] 如本文所用,术语“ $K_D$ ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。

[0120] 术语“表位”是指与称为互补位的抗体分子可变区中的特异性抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个的表位。因此,不同抗体可以与抗原上的不同区域结合并且可以具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链不同区段的空间并列的氨基酸产生线性表位是由多肽链中相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖、磷酸基或磺酰基的部分。

[0121] 根据某些实施方案,本发明方法中使用的抗ANGPTL8和抗 ANGPTL3抗体是具有pH依赖性结合特征的抗体。如本文所用,表达“pH 依赖性结合”意指抗体或其抗原结合片段显示“与中性pH相比,在酸性pH 与ANGPTL8的结合作用降低”(出于本公开的目的,两种表述可以互换使用),或者“与中性pH相比,在酸性pH与ANGPTL3的结合作用降低”(出于本公开的目的,两种表述可以互换使用)。例如,“具有pH依赖性结合特征”的抗体包括相比酸性pH,在中性pH以更高亲和力与ANGPTL8或与ANGPTL3结合的抗体和其抗原结合片段。在某些实施方案中,相比酸性pH,本发明的抗体和抗原结合片在中性pH以至少3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更高倍的亲和力结合ANGPTL8或ANGPTL3。

[0122] 根据本发明的这个方面,具有pH依赖性结合特征的抗ANGPTL8抗体或ANGPTL3抗体可以相对于亲本抗ANGPTL8抗体或亲本抗 ANGPTL3抗体拥有一个或多个氨基酸变异。例如,具有pH依赖性结合特征的抗ANGPTL8抗体或抗ANGPTL3抗体可以例如,在亲本抗 ANGPTL8抗体或亲本抗ANGPTL3抗体的一个或多个CDR中含有一个或多个组氨酸置换或插入。因此,根据本发明的某些实施方案,提供这样的方法,所述方法包括施用包含CDR氨基酸序列(例如,重链CDR和轻链CDR)的抗ANGPTL8抗体和抗ANGPTL3抗体,所述CDR氨基酸序列与亲本抗ANGPTL8抗体或亲本ANGPTL3抗体的CDR氨基酸序列相同,例外是亲本抗体的一个或多个CDR的一个或多个氨基酸置换成组氨酸残基。具有pH依赖性结合作用的抗ANGPTL8抗体或抗ANGPTL3抗体可以例如拥有1、2、3、4、5、6、7、8、9或更多个组氨酸置换,所述组氨酸置换在亲本抗体的单个CDR内部或分布遍及亲本抗ANGPTL8抗体或亲本抗ANGPTL3抗体的多个(例如,2,3,4,5或6个)CDR。例如,本发明包括具有pH依赖性结合作用的抗ANGPTL8抗体和抗ANGPTL3 抗体的用途,所述抗体包含在亲本抗ANGPTL8抗体或亲本抗ANGPTL3 抗体的HCDR1中的一个或多个组氨酸置换、在其HCDR2中的一个或多个组氨酸置换、在其HCDR3中的一个或多个组氨酸置换、在其LCDR1 中的一个或多个组氨酸置换、在其LCDR2中的一个或多个组氨酸置换和/ 或在其LCDR3中的一个或多个组氨酸置换。

[0123] 如本文所用,表述“酸性pH”意指6.0或更小(例如,小于约6.0、小于约5.5、小于约

5.0等)的pH。表述“酸性pH”包括约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或更小的pH值。如本文所用,表述“中性pH”意指约7.0至约7.4的pH。表述“中性pH”包括约7.0、7.05、7.1、7.15、7.2、7.25、7.3、7.35和7.4的pH值。

[0124] 可用于本发明上下文的抗ANGPTL8抗体的非限制性实例包括抗 ANGPTL8抗体,其包含SEQ ID NO:1的重链可变区 (HCVR) 中包含的三个重链互补决定区 (HCDR) 和包含在SEQ ID NO:5的轻链可变区 (LCVR) 中的三个轻链互补决定区 (LCDR)。在一个实施方案中,可用于本发明的上下文的抗ANGPTL8抗体包括这样的抗ANGPTL8抗体,其包含SEQ ID NO:2的HCDR1,SEQ ID NO:3的HCDR2,SEQ ID NO: 4的HCDR3,SEQ ID NO:6的LCDR1,SEQ ID NO:7的LCDR2和 SEQ ID NO:8的LCDR3。在一个实施方案中,可以在本发明的上下文中使用的抗ANGPTL8抗体包括含有SEQ ID NO:1/5的HCVR/LCVR氨基酸序列对的抗ANGPTL8抗体。

[0125] 可用于本发明上下文的抗ANGPTL3抗体的非限制性实例包括 evinacumab,其包含SEQ ID NO:10的重链可变区 (HCVR) 中包含的三个重链互补决定区 (HCDR) 和SEQ ID NO:14的轻链可变区 (LCVR) 中包含的三个轻链互补决定区 (LCDR)。Evinacumab包含SEQ ID NO:11的HCDR1,SEQ ID NO:12的HCDR2,SEQ ID NO:13的HCDR3, SEQ ID NO:15的LCDR1,SEQ ID NO:16的LCDR2和SEQ ID NO: 17的LCDR3。Evinacumab包含SEQ ID NO:10/14的HCVR/LCVR氨基酸序列对。

#### [0126] 制备人抗体

[0127] 可以根据本领域已知的产生/分离抗体的任何方法,产生抗ANGPTL8 抗体和抗ANGPTL3抗体。例如,用于本发明方法中的抗体可以通过杂交瘤技术、通过噬菌体展示、通过酵母展示等产生。用于本发明方法中的抗体可以例如是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

[0128] 转基因小鼠中产生人抗体的方法是本领域已知的。任何这类已知方法可以在本发明的背景下用来产生特异性结合ANGPTL8或ANGPTL3的人抗体。

[0129] 例如,使用VELOCIMMUNE<sup>TM</sup>技术(参见例如US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals)或任何其他已知的用于产生单克隆抗体的方法,最初分离具有人可变区和小鼠恒定区的针对ANGPTL8或ANGPTL3 的高亲和力嵌合抗体。**VELOCIMMUNE®**技术包括产生转基因小鼠,所述转基因小鼠具有包含与内源性小鼠恒定区基因座可操作连接的人重链和轻链可变区的基因组,使得所述小鼠产生响应于抗原刺激的包含人可变区和小鼠恒定区的抗体。分离编码抗体重链和轻链可变区的DNA并可操作地连接到编码人重链和轻链恒定区的DNA上。然后在能够表达完整人抗体的细胞中表达DNA。

[0130] 通常,用感兴趣的抗原攻击**VELOCIMMUNE®**小鼠,从表达抗体的小鼠中回收淋巴细胞(如B细胞)。可以将淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以制备永生的杂交瘤细胞系,筛选和选择这些杂交瘤细胞系以鉴定产生对感兴趣的抗原特异的抗体的杂交瘤细胞系。分离编码重链和轻链可变区的 DNA并连接到期望的重链和轻链同种型恒定区。这样的抗体蛋白可以在细胞如CHO细胞中产生。或者,可以直接从抗原特异性淋巴细胞中分离编码抗原特异性嵌合抗体或轻链和重链的可变结构域的DNA。

[0131] 起初,分离具有人可变区和小鼠恒定区的高亲和力嵌合抗体。对所述抗体进行表征和选择期望的特征,包括亲和力、选择性、表位等,使用本领域技术人员已知的标准方法。然后用期望的人恒定区置换小鼠恒定区以产生本发明的完整人抗体,例如野生型或修饰的

IgG1或IgG4。虽然所选恒定区可根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。

[0132] 通常,通过与固相上固定或在溶液相中的抗原结合所测量时,如上文所述,可以在本发明方法中使用的抗体拥有高亲和力。将小鼠恒定区替换为所需的人类恒定区以产生本发明的全人抗体。虽然所选恒定区可根据具体用途而变化,但高亲和力抗原结合和靶特异性特征存在于可变区中。

[0133] 可以在本发明方法的上下文中使用的特异性结合ANGPTL8的人抗体或抗体的抗原结合片段的具体实例包括这样的抗体或抗原结合蛋白,其包含来自含有SEQ ID NO:12/17的重链和轻链可变区 (HCVR/LCVR) 氨基酸序列对的六个CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和 LCDR3)。

[0134] 在本发明的某些实施方案中,可以在本发明方法中使用的抗 ANGPTL8抗体或其抗原结合片段包含了含有SEQ ID NO:2、3、4、6、7和8的氨基酸序列的重链和轻链互补决定区 (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3)。

[0135] 在本发明的某些实施方案中,可以在本发明方法中使用的抗 ANGPTL8抗体或其抗原结合片段包含了具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的LCVR。

[0136] 可以在本发明方法的上下文中使用的特异性结合ANGPTL3的人抗体或抗体的抗原结合片段的具体实例包括这样的抗体或抗原结合蛋白,其包含来自含有SEQ ID NO:10/14的重链和轻链可变区 (HCVR/LCVR) 氨基酸序列对的六个CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和 LCDR3)。

[0137] 在本发明的某些实施方案中,可以在本发明方法中使用的抗 ANGPTL3抗体或其抗原结合片段包含了包含SEQ ID NO:11、12、13、15、16和17的氨基酸序列的重链和轻链互补决定区 (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3)。

[0138] 在本发明的某些实施方案中,可以在本发明方法中使用的抗 ANGPTL3抗体或其抗原结合片段包含了具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCVR和具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCVR。

[0139] 药物组合物和施用方法

[0140] 本发明包括这样的方法,所述方法包括向患者施用与ANGPTL3抑制剂组合的ANGPTL8抑制剂,其中ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂包含在相同的或不同的药物组合物内。本发明的药物组合物与合适的载体、赋形剂和提供合适的转运、递送、耐受性等的其他试剂一起配制。在所有药物化学家已知的处方集中可以找到许多合适的制剂:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括例如粉末、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)囊泡(如LIPOFECTIN<sup>TM</sup>)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、聚乙二醇乳液(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有聚乙二醇的半固体混合物。也参见Powell等人,"Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0141] 可以在本发明背景下使用的包含抗ANGPTL8抗体和/或ANGPTL3 抗体的示例性药物制剂包括如US 8,795,669中或W02013/166448或 W02012/168491中所述的任何制剂。

[0142] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如包封在脂质

体、微粒、微胶囊中、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的胞吞作用(参见例如Wu等人,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。施用方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用组合物,例如通过输注或推注、通过上皮或粘膜皮肤内层(mucocutaneous linings)(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)的吸收,并且可以与其他生物学活性剂一起施用。

[0143] 可以用标准的针头和注射器皮下或静脉内递送本发明的药物组合物。此外,相对于皮下递送,笔递送装置容易地应用于递送本发明的药物组合物。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常使用含有药物组合物的可更换的药筒。一旦药筒内的所有药物组合物被施用并且药筒是空的,则可以容易地丢弃空药筒并用含有药物组合物的新药筒替换。然后可以重新使用笔递送装置。在一次性笔递送装置中,没有可替换的药筒。相反,一次性笔递送装置预装有容纳在装置内储存器中的药物组合物。一旦储存器中的药物组合物清空,就丢弃整个装置。

[0144] 许多可重复使用的笔和自动注射器递送装置应用于皮下递送本发明的药物组合物中。实例包括但不限于AUTOPEN<sup>TM</sup>(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC<sup>TM</sup>笔(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25<sup>TM</sup>笔、HUMALOG<sup>TM</sup>笔、HUMALIN 70/30<sup>TM</sup>笔(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN<sup>TM</sup> I, II和III(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR<sup>TM</sup> (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD<sup>TM</sup>笔(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN<sup>TM</sup>、OPTIPEN PRO<sup>TM</sup>、OPTIPEN STARLET<sup>TM</sup>和OPTICLIK<sup>TM</sup>(Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany),仅举几个例子。应用于皮下递送本发明药物组合物的一次性笔递送装置的例子包括但不限于SOLOSTAR<sup>TM</sup>笔(Sanofi-Aventis)、FLEXPEN<sup>TM</sup>(Novo Nordisk)和KWIKPEN<sup>TM</sup>(Eli Lilly)、SURECLICKTM自动注射器(Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLETTM(Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN(Dey, L.P.)和HUMIRATM笔(Abbott Labs, Abbott Park IL),仅举几个例子。

[0145] 在某些情况下,药物组合物可以在控释系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed. Eng.14:201)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料;参见Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又一个实施方案中,可以将控释系统放置在组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如Goodson, 1984,in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, 第115-138页)。其他控释系统在Langer,1990,Science 249:1527-1533的综述中进行了讨论。

[0146] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。这些可注射制剂可以通过已知的方法制备。例如,可以通过将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备可注射制剂。作为注射用水性介质,例如有生理盐水、含有葡萄糖的等渗溶液和其他助剂等,其可以与适当的增溶剂如醇(例如乙醇)、多元醇(例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂[例如聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等组合使用。作为油性介质,例如使用芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂如苯甲酸苄酯、苯甲醇等组合使用。由此制备的注射剂优选填充在合适的安瓿中。

[0147] 有利地,将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适于装配活性成分剂量的单位剂量的剂型。这种单位剂量的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿)、栓剂等。

[0148] 剂量

[0149] 根据本发明的方法施用至受试者的ANGPTL8抑制剂(例如,抗ANGPTL8抗体)或ANGPTL3抑制剂(例如,抗ANGPTL3抗体)的量通常是治疗有效量。如本文所用,短语“ANGPTL8抑制剂的治疗有效量”意指这样的ANGPTL8抑制剂剂量,其中与ANGPTL3抑制剂组合施用时,所述剂量导致选自总胆固醇、LDL-C、ApoB100、非HDL-C、VLDL-C、甘油三酯、Lp(a)和残余胆固醇(*remnant cholesterol*)的一项或多项参数可检出的降低(距基线降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多),或者这样的量,所述量减少或消除患者对其他治疗用干预(如,脂蛋白清血法)的需求或降低患者的标准化清血率。

[0150] 在抗ANGPTL8抗体的情况下,治疗有效量可以是约0.05mg至约600 mg,例如,约0.05mg、约0.1mg、约1.0mg、约1.5mg、约2.0mg、约 10mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约 140mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg、约200mg、约 210mg、约220mg、约230mg、约240mg、约250mg、约260mg、约 270mg、约280mg、约290mg、约300mg、约310mg、约320mg、约 330mg、约340mg、约350mg、约360mg、约370mg、约380mg、约 390mg、约400mg、约410mg、约420mg、约430mg、约440mg、约 450mg、约460mg、约470mg、约480mg、约490mg、约500mg、约510mg、约520mg、约530mg、约540mg、约550mg、约560mg、约 570mg、约580mg、约590mg,或约600mg的抗ANGPTL8抗体。根据本发明的某些示例性实施方案,抗ANGPTL8抗体的治疗有效量是75mg、150mg或300mg(例如,在alirocumab的情况下)、或140mg或420mg(例如,在evolocumab的情况下)。ANGPTL8抑制剂的其他给药量将对本领域普通技术人员而言显而易见并且构思于本发明的范围内。

[0151] 含于各个剂量内部的抗ANGPTL8抗体的量可以用毫克抗体/千克患者体重(即,mg/kg)表述。例如,抗ANGPTL8抗体可以按约0.0001至约 10mg/kg患者体重的剂量施用给患者。

[0152] 根据本发明的方法施用至受试者的ANGPTL3抑制剂(例如,抗ANGPTL3抗体)的量通常是治疗有效量。如本文所用,短语“ANGPTL3抑制剂的治疗有效量”意指这样的ANGPTL3抑制剂剂量,其中与ANGPTL8抑制剂组合施用时,所述剂量导致选自总胆固醇、LDL-C、ApoB100、非HDL-C、VLDL-C、甘油三酯、Lp(a)和残余胆固醇的一项或多项参数可检出的降低(距基线降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或更多),或防止或减弱受试者中动脉粥样硬化的量(如本文他处描述)。

[0153] 在抗ANGPTL3抗体的情况下,治疗有效量可以是约0.05mg至约600 mg,例如,约0.05mg、约0.1mg、约1.0mg、约1.5mg、约2.0mg、约 10mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约 140mg、约160mg、约170mg、约180mg、约190mg、约200mg、约 210mg、约220mg、约230mg、约240mg、约250mg、约260mg、约 270mg、约280mg、约290mg、约300mg、约310mg、约320mg、约 330mg、约340mg、约350mg、约360mg、约370mg、约380mg、约 390mg、约400mg、约410mg、约420mg、约430mg、约440mg、约 450mg、约460mg、约470mg、约480mg、约490mg、约500mg、约 510mg、约520mg、约

530mg、约540mg、约550mg、约560mg、约570mg、约580mg、约590mg,或约600mg的抗ANGPTL3抗体。ANGPTL3抑制剂的其他给药量将对本领域普通技术人员而言显而易见并且构思于本发明的范围内。

[0154] 含于各个剂量内部的抗ANGPTL3抗体的量可以用毫克抗体/千克患者体重(即,mg/kg)表述。例如,抗ANGPTL3抗体可以按约0.0001至约 10mg/kg患者体重的剂量施用给患者。

[0155] 联合疗法

[0156] 如本文他处描述,本发明的方法可以包括向患者施用与ANGPTL3抑制剂组合的ANGPTL8抑制剂,其中所述患者不响应于标准降脂疗法、不充分受其控制或对其不耐受。在某些实施方案中,可以完全消除进一步施用降脂疗法的需求。在某些实施方案中,ANGPTL8抑制剂与ANGPTL3 抑制剂的组合使用可以与先前开具给患者的降脂疗法联合使用。例如,在降低患有高脂血症(例如高胆固醇血症或高甘油三酯症)的患者中至少一个脂质/脂蛋白参数的背景下,其中患者不响应于标准降脂疗法、不充分受其控制或对其不耐受,ANGPTL8抑制剂与ANGPTL3抑制剂的组合可以与稳定的每日治疗性他汀方案组合施用至患者。在本发明背景下ANGPTL8 抑制剂加ANGPTL3抑制剂可以与之组合施用的示例性每日治疗性他汀方案例如包括阿托伐他汀(每日10、20、40或80mg)、(每日阿托伐他汀/依折麦布10/10mg或40/10mg)、瑞舒伐他汀(每日5、10或20mg)、西立伐他汀(cerivastatin) (每日0.4或0.8mg)、匹伐他汀(每日1、2或4mg)、氟伐他汀(每日20、40或80mg)、辛伐他汀(每日5、10、20、40或80mg)、辛伐他汀/依折麦布(每日10/10、20/10、40/10或80/10mg)、洛伐他汀(每日10、20、40或80mg)、普伐他汀(每日10、20、40或80mg)及其组合。在本发明背景下ANGPTL8抑制剂加ANGPTL3抑制剂可以与之组合施用的其他脂质调节疗法例如包括(1)抑制胆固醇摄取和或胆汁酸重吸收的活性剂(例如,依折麦布);(2)增加脂蛋白分解代谢的活性剂(如烟酸);和/或(3)在胆固醇消除中发挥作用的LXR转录因子的激活物如22-羟胆固醇。

[0157] 可用于本发明上下文的抗ANGPTL8抗体的非限制性实例包括含有SEQ ID NO:1/5的HCVR/LCVR氨基酸序列对的抗体,或其抗原结合部分。

[0158] 用于本发明上下文的ANGPTL3抗体的非限制性实例包括 evinacumab,其包含SEQ ID NO:10/14的HCVR/LCVR氨基酸序列对,或其抗原结合部分。

[0159] 施用方案

[0160] 根据本发明的某些实施方案,多剂ANGPTL8抑制剂(即,包含 ANGPTL8抑制剂的药物组合物)和ANGPTL3抑制剂(即,包含ANGPTL3 抑制剂的种药物组合物)可以在限定的时间过程范围内(例如,接续每日治疗性他汀方案或其他背景脂质调节疗法)施用至受试者。根据本发明的这个方面的方法包括向受试者依次施用多剂ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂。如本文所用,“依次施用”意指在不同时间点,例如,在预定间隔(例如,数小时,数天、数周或数月)分隔的不同天向受试者施用每剂 ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂。本发明包括这样的方法,所述方法包括向患者依次施用单一初始剂的ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂,随后施用一个或多个二级剂的ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂,并且任选地随后施用一个或多个三级剂的ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3 抑制剂。

[0161] 术语“初始剂量”、“二级剂量”和“三级剂量”是指各剂包含ANGPTL8 抑制剂和ANGPTL3抑制剂的药物组合物的施用的时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“二级剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;“三级剂量”是

在二级剂量之后施用的剂量。初始、二级和三级剂量都可以含有相同量的ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂,但通常在施用频率方面可能彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程中初始、二级和/或三级剂量中所含的ANGPTL8 抑制剂和ANGPTL3抑制剂的量彼此不同(例如适当地调高或调低)。在某些实施方案中,在治疗方案开始时将两个或更多个(例如2、3、4或5)剂量作为“负载剂量”施用,随后以较低频率基础施用后续剂量(例如“维持剂量”)。

[0162] 根据本发明的某些示例性实施方案,在紧接之前的剂量1至26(例如,1、11/2、2、21/2、3、31/2、4、41/2、5、51/2、6、61/2、7、71/2、8、81/2、9、91/2、10、101/2、11、111/2、12、121/2、13、131/2、14、141/2、15、151/2、16、161/2、17、171/2、18、181/2、19、191/2、20、201/2、21、211/2、22、221/2、23、231/2、24、241/2、25、251/2、26、261/2或更多)周之后施用每个二级和/或三级剂量。如本文所用,短语“紧接之前的剂量”是指在多次施用的顺序中,在施用顺序中没有间隔剂量的紧邻下一个剂量之前向患者施用的抗原结合分子的剂量。

[0163] 根据本发明该方面的方法可以包括向患者施用任何次数的二级和/或三级剂量的ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单次二级剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如2、3、4、5、6、7、8次或更多次)二级剂量。同样地,在某些实施方案中,仅向患者施用单次三级剂量。在其他实施方案中,向患者施用两次或更多次(例如2、3、4、5、6、7、8或更多次)三级剂量。

[0164] 在包括多次二级剂量的实施方案中,每个二级剂量可以与其他二级剂量以相同的频率施用。例如,可以在紧接之前的剂量后1至2、4、6、8 或更多周向患者施用每个二级剂量。相似地,在包括多次三级剂量的实施方案中,每个三级剂量可以与其他三级剂量以相同的频率施用。例如,可以在紧接之前的剂量后1至2、4、6、8或更多周向患者施用每个三级剂量。可选地,向患者施用二级和/或三级剂量的频率可以在治疗方案的过程中变化。也可以在治疗过程中由医生根据临床检查后个体患者需要调整施用的频率。

## 实施例

[0165] 提供以下实施例从而为本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明方法和组合物的完整公开和描述,并且不意图限制本发明人视为其发明的范围。已经作出努力以确保所用数字(例如量、温度等)方面的准确度,但是应当考虑一些实验性误差和偏差。除非另外指明,否则份数是以重量计的份数,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,并且压力是在大气压或接近大气压。

[0166] 实施例1产生针对人ANGPTL8的人抗体

[0167] 通过用包含用C末端小鼠IgG2a Fc标签(参见SEQ ID NO:9)表达的重组人ANGPTL8的免疫原免疫**VELOCIMMUNE®**小鼠(即,包含编码人免疫球蛋白重链和κ轻链可变区的DNA的工程化小鼠)获得抗 ANGPTL8抗体。通过ANGPTL8特异性免疫测定监测抗体免疫应答。当实现期望的免疫应答时,从抗原阳性B细胞产生几种完全人抗ANGPTL8 抗体,如US2007/0280945A1中所述,其通过引用整体并入本文。

[0168] 以下实施例中所用的示例ANGPTL8抑制剂是人抗ANGPTL8抗体,命名为“H4H15341P”。包含SEQ ID NO:1的重链可变区(HCVR)和包含 SEQ ID NO:5的轻链可变结构域(LCVR);包含SEQ ID NO:2的重链互补决定区1(HCDR1)、包含SEQ ID NO:3的HCDR2、包含SEQ ID NO: 4的HCDR3、包含SEQ ID NO:6的轻链互补决定区1(LCDR1)、包含SEQ ID NO:7的

LCDR2和包含SEQ ID NO:8的LCDR3。

[0169] 实施例2产生针对人ANGPTL3的人抗体

[0170] 人抗ANGPTL3抗体如美国专利号9,018,356中所述产生。以下实施例中所用的示例性ANGPTL3抑制剂是人抗ANGPTL3抗体，命名为“H4H1276S”，又称作“evinacumab”。H4H1276S具有以下氨基酸序列特征：包含SEQ ID NO:10的重链可变区 (HCVR) 和包含SEQ ID NO:14的轻链可变结构域 (LCVR)；包含SEQ ID NO:11的重链互补决定区1 (HCDR1)、包含SEQ ID NO:12的HCDR2、包含SEQ ID NO:13的 HCDR3、包含SEQ ID NO:15的轻链互补决定区1 (LCDR1)、包含SEQ ID NO:16的LCDR2和包含SEQ ID NO:17的LCDR3。

[0171] 实施例3：抗ANGPTL3抗体对ANGPTL8敲除 (KO) 和野生型 (WT) 小鼠中循环甘油三酯和胆固醇水平的体内作用

[0172] 在Angpt18敲除和野生型小鼠中评估ANGPTL3抗体H4H1276S对血清甘油三酯 (TG) 和总胆固醇的影响。在实验前5天，在禁食-重新喂料条件下(在禁食过夜后重新喂料6小时)对小鼠进行预先放血。基于它们的TG和总胆固醇基线值将小鼠分选到组中(每种抗体每种基因型5只小鼠)。该抗体、具有不相关特异性的同种型匹配 (hIgG4) 对照和H4H1276S (抗ANGPTL3) 在研究的第0天以10mg/kg通过单剂量皮下注射施用。在禁食-重新喂料条件下在第2天和第8天对小鼠放血，并通过**ADVIA®1800 Chemistry System** (Siemens) 测定在血清中的TG和总胆固醇水平。计算每个时间点的平均值。表示为(平均值±SEM) 的结果显示在图1和图2中。图1显示了ANGPTL8 KO小鼠和WT小鼠中甘油三酯水平的结果。图2显示了ANGPTL8 KO小鼠和WT小鼠中总胆固醇水平的结果。

[0173] 结果概述：

[0174] 在Angpt18敲除和野生型小鼠中评估ANGPTL3抗体H4H1276S对循环TG和总胆固醇水平的影响。H4H1276S治疗导致野生型小鼠的循环TG 和总胆固醇水平显著降低，与之前报道的一致 (Gusarova等人, 2015, *J. Lipid Res.* (2015), Jul; 56 (7): 1308-17)。H4H1276S还导致Angpt18 敲除小鼠中TG水平的显著降低，其已经由于Angpt18缺失而具有降低的基线 TG水平。通过H4H1276S处理Angpt18敲除小鼠，总胆固醇也显著降低。这些数据表明ANGPTL3 和ANGPTL8的抑制可能对循环TG水平具有累加效应。

[0175] 实施例4：抗ANGPTL8和抗ANGPTL3及其组合对人源化ANGPTL8 小鼠中循环甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TC) 的体内作用

[0176] 在人源化ANGPTL8小鼠中评估抗ANGPTL8和抗ANGPTL3抗体的组合治疗对血清甘油三酯 (TG) 和总胆固醇水平的影响。在实验前6天，在非禁食条件下对小鼠进行预先放血。基于它们的基线TG和体重值将小鼠分选到组中(每种抗体或测试的抗体组合各5只小鼠)。该抗体通过单剂量皮下注射在研究的第0天施用：具有不相关特异性的同种型-匹配的 (hIgG4) 对照，H4H15341P和H4H1276S以3mg/kg的剂量施用和 H4H15341P和H4H1276S的组合以2个剂量施用-每种1.5mg/kg或 3mg/kg。在注射抗体后第1、4、8和14天对小鼠进行放血 (非禁食)，通过**ADVIA®1800 Chemistry System** (Siemens) 测定在血清中的TG和总胆固醇水平。计算每个时间点的平均值。表示为(平均值±SEM) 的结果显示在图3和图4中。图3显示了当单独使用ANGPTL3或ANGPTL8 抗体时或当它们组合使用时对甘油三酯的影响。在给药后第1、4、7和14 天进行测量。图4显示了当单独使用ANGPTL3或ANGPTL8抗体时，或当它们组合使用时对总胆固醇水平的影响。在给药后第1、4、7和14天进行测量。

[0177] 结果概述：

[0178] 在人源化ANGPTL8小鼠中测试了H4H15341P(抗hANGPTL8)和H4H1276S(抗ANGPTL3)的组合治疗对循环TG水平的影响。单个mAb或组合的给药导致循环TG水平的显著降低,其中组合治疗与单个mAb作用相比显示出对血清TG水平的累加效应。

[0179] 实施例5:关于AngPTL3和AngPTL8的相互作用的研究

[0180] 血管生成素样蛋白3(ANGPTL3)和ANGPTL8是分泌蛋白和脂蛋白脂酶(LPL)介导的血浆甘油三酯清除的抑制剂。研究了这些ANGPTL蛋白如何相互作用以调节LPL活性来向组织提供适当量的脂肪酸用于储存或氧化。ANGPTL3抑制LPL活性并增加小鼠血清甘油三酯(TG),而与ANGPTL8无关。用ANGPTL3阻断抗体可以逆转对LPL活性和血清TG的影响。发现ANGPTL8具有功能性LPL抑制基序,但需要ANGPTL3抑制LPL并增加小鼠的血清TG。定点诱变表明,ANGPTL8阻断LPL活性和增加血清TG的能力不需要具有功能性LPL抑制基序的ANGPTL3。ANGPTL8的C末端抗体(参见实施例6)在ANGPTL3存在下逆转ANGPTL8对LPL的抑制。该抗体不破坏ANGPTL8:ANGPTL3复合物,但非常接近ANGPTL8的N末端的LPL抑制基序。总之,这些数据显示了ANGPTL8具有功能性LPL抑制基序,但在ANGPTL3存在下仅能抑制LPL(Haller, J.等人,Nature Scientific Reports,2017年提交)。

[0181] 实施例6:抗ANGPTL8阻断抗体逆转ANGPTL8诱导的LPL抑制而不破坏ANGPTL3相互作用

[0182] 使用长度为15个氨基酸且具有一个残基的抵消的肽文库来鉴定以高亲和力结合人ANGPTL8的8种单克隆抗体的表位( $K_d = 2.4 \times 10^{-10}$ 至 $5.8 \times 10^{-9}$ M;图5)。表位如图6a所示。抗体不与小鼠ANGPTL8交叉反应,并在人源化ANGPTL8小鼠中测试体内功效(Gusarova等人,2017年提交)。令人惊讶的是,仅一种抗体(mAb 7或H4H15341P)产生血清TG的显著降低(图6b)。该抗体结合ANGPTL8的C末端区域的表位(氨基酸171-180)(图6a)。最近报道了该抗体还使食蟹猴的循环TG降低了65%(Gusarova等人,2017年提交)。图6c显示了抗体剂量依赖性( $EC_{50} = 0.47$ nM)逆转ANGPTL8对LPL的抑制作用。该研究在共表达ANGPTL3的HEK293细胞中进行。

[0183] 由于抗ANGPTL8阻断抗体结合C-末端部分并且LPL抑制基序位于N-末端区域,想要通过破坏ANGPTL3和ANGPTL8的相互作用来测试它是否介导其作用。为此,使用AlphaLISA邻近测定法,其中当ANGPTL3和ANGPTL8一起表达时检测到信号(图6d,左)。即使测试到高浓度的抗体,AlphaLISA信号仍然很强。这些数据表明抗ANGPTL8阻断抗体不会通过破坏ANGPTL8:ANGPTL3相互作用来恢复LPL活性。

[0184] 最近结构建模预测ANGPTL8以使N-和C-末端结构域紧密接近的方式折叠(Siddiqa等人(2016)Comput Biol Chem,61,210-220)。因此,假设ANGPTL8阻断抗体可以在空间上屏蔽ANGPTL8中的抑制基序以防止LPL抑制。为了测试该假设,标记ANETTL8阻断抗体和ANGPTL8的非阻断性抗体(mAb4(H4H15347P)),通过FRGP受体染料,其结合ANGPTL8蛋白质序列的中间区域。此外,在其N-末端位点用供体染料标记ANGPTL8,如图6e所示。当标记的ANGPTL8与ANGPTL3在HEK293细胞中共表达并用标记的抗体进行测定时,检测到更强的TR-FRET信号,其中与非阻断抗体相比,ANGPTL8阻断抗体针对C末端片段(图6f)。这些结果表明ANGPTL8的N-和C-末端位于非常接近的位置,并且ANGPTL8阻断抗体可以在空间上阻止ANGPTL8抑制基序与LPL的结合。

[0185] 材料和方法：

[0186] 表位作图。表位作图由PEPSCAN PRESTO BE进行。简而言之,标准Fmoc-肽合成用于合成具有14个氨基酸重叠的15个氨基酸长肽。在基于PEPSCAN的ELISA中测试与每种肽结合的抗体:将第一抗体以1 $\mu$ g/ml (在4℃过夜)温育,然后与山羊抗人HRP缀合物一起温育(在25℃下1 小时)。洗涤后,加入过氧化物酶底物2,2'-连氨基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(ABTS)和10 $\mu$ l/ml的3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,并使用电荷耦合装置照相机测量显色。

[0187] AlphaLISA测定。在室温下以384孔板形式进行测定。将来自用含有 ANGPTL3-myc 和ANGPTL8-V5的载体或空载体转染的细胞的CHO-K1 细胞培养基(2.5 $\mu$ l)与指定量的抗体一起温育1小时,最终体积为20 $\mu$ l。然后加入抗V5 $\alpha$ 受体珠(PerkinElmer)并再温育30分钟,然后与生物素化的抗myc抗体(内部产生)和链霉亲和素 $\alpha$ 供体珠(PerkinElmer)温育1小时。所有稀释均在Hi-Block缓冲液(PerkinElmer)中进行,珠子的终浓度为10ng/ml,生物素化抗体的终浓度为10nM,总体积为50 $\mu$ l。按照制造商的说明,在**Envision® Multilabel Reader**(PerkinElmer)中测量 AlphaLISA信号。

[0188] TR-FRET抗体实验。使用TransIT-LT1转染试剂,用编码ANGPTL3 的质粒和编码N-末端Avi标记的ANGPTL8的质粒共转染HEK293T细胞。72小时后收集细胞培养基,使用具有10kDa分子截止值的Centriprep (Millipore) 过滤单元浓缩20倍,并使用生物素-蛋白质连接酶BirA (Avidity) (Fairhead&Howarth, 2015) 按照供应商说明进行直接生物素化,然后针对PBS透析。使用链霉亲和素-HRP进行检测,通过Western 印迹证实Avi-ANGPTL8的生物素化。使用Alexa FluorTM 647抗体标记试剂盒(Invitrogen)标记抗体。用分光光度法测定抗体和染料浓度,并将 5:2的药物与抗体比例用于所有实验。TR-FRET以384孔板形式进行。最终浓度为TR-FRET稀释缓冲液(PerkinElmer)中的31.3nM铕-链霉亲和素,25nM标记抗体,50%生物素-Avi-ANGPTL8。TR-FRET是使用**Envision® Multilabel Reader**(PerkinElmer),激发滤光片340/30nm,发射滤光片1-615/8.5nm,发射滤光片2-665/7.5nm,二向色镜D400/D630测量,延迟测量100ms并且窗口时间为2ms。

<110> 瑞泽恩制药公司(REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.)

<120> 用ANGPTL8抑制剂和ANGPTL3抑制剂治疗高脂血症的方法

<130> 0431.25PCT

<140>

<141>

<150> 62/453,110

<151> 2017-02-01

<150> 62/319,980

<151> 2016-04-08

<160> 19

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述：合成多肽”

[0001]

<220>

<221> 来源

<223> /注释="HCVR"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn His  
20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Val Thr Tyr Ala Asp Phe Leu  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Asp His Leu Ser Gly Thr Ser Pro Leu Ser Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 2  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= “人工序列的描述: 合成肽”

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= "HCDR1"

<400> 2  
 Gly Phe Thr Phe Asn Asn His Glu  
 1 5

[0002] <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= “人工序列的描述: 合成肽”

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= "HCDR2"

<400> 3  
 Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Val  
 1 5

<210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= “人工序列的描述: 合成肽”

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= "HCDR3"

<400> 4  
 Ala Arg Asp His Leu Ser Gly Thr Ser Pro Leu Ser Tyr  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= “LCVR”

<400> 5  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 [0003]

Phe Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Glu Asn Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 6  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /注释= “人工序列的描述: 合成肽”

<220>  
 <221> 来源

<223> /注释="LCDR1"

<400> 6  
Gln Asp Ile Asn Asn Tyr  
1 5

<210> 7  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= "人工序列的描述: 合成肽"

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="LCDR2"

<400> 7  
Asp Ala Ser  
1

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
[0004] <213> 人工序列

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= "人工序列的描述: 合成肽"

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="LCDR3"

<400> 8  
Gln Gln Tyr Glu Asn Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 9  
<211> 413  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= "人工序列的描述: 合成多肽"

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释="hANGPTL8-mFc  
aa 1-177: NP\_061157.3的氨基酸22-198  
aa 178-413: GPG接头和小鼠IgG2a Fc标签"

&lt;400&gt; 9

Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His Glu Glu Leu Thr Leu  
 1 5 10 15

Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala Leu Asn Gly Val Tyr  
 20 25 30

Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg Asn Ser Leu Gly Leu  
 35 40 45

Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu Val Ser Arg Gly Arg  
 50 55 60

Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu Glu Thr Gln Met Glu  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr Ala Glu Val Leu Gly  
 85 90 95

Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp Ser Val Gln Arg Leu  
 100 105 110

[0005] Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro Ala Tyr Arg Glu Phe  
 115 120 125

Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser His Ile Leu Trp Ala  
 130 135 140

Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu Met Val Ala Gln Gln  
 145 150 155 160

His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His Thr Ala Ala Leu Pro  
 165 170 175

Ala Gly Pro Gly Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro  
 180 185 190

Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
 195 200 205

Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile  
 210 215 220

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln

225	230	235	240
Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln			
245	250	255	
Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu			
260	265	270	
Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys			
275	280	285	
Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys			
290	295	300	
Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro			
305	310	315	320
Glu Glu Glu Met Thr Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr			
325	330	335	
Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys			
340	345	350	
[0006]			
Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
355	360	365	
Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val			
370	375	380	
Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn			
385	390	395	400
His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys			
405	410		
<210> 10			
<211> 126			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释= “人工序列的描述：合成多肽”			
<220>			
<221> 来源			

<223> /注释="Evinacumab HCVR"

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Ile Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Phe Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Asp Leu Arg Asn Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Pro Asp Ala  
[0007] 100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<220>

<221> 来源

<223> /注释="Evinacumab HCDR1"

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释= “人工序列的描述：合成肽”

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释= "Evinacumab HCDR2"

&lt;400&gt; 12

Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr

1 5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释= “人工序列的描述：合成肽”

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释= "Evinacumab HCDR3"

&lt;400&gt; 13

Ala Lys Asp Leu Arg Asn Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Pro Asp Ala

1 5 10 15

[0008]

Phe Asp Ile

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释= “人工序列的描述：合成多肽”

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 来源

&lt;223&gt; /注释= "Evinacumab LCVR"

&lt;400&gt; 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 15  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

[0009]  
<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= "Evinacumab LCDR1"

<400> 15  
Gln Ser Ile Arg Ser Trp  
1 5

<210> 16  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “人工序列的描述：合成肽”

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= "Evinacumab LCDR2"

<400> 16  
Lys Ala Ser  
1

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成肽”

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “Evinacumab LCDR3”

<400> 17

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr

1 5

<210> 18

<211> 460

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “人工序列的描述: 合成多肽”

<220>

<221> 来源

<223> /注释= “hANGPTL3”

[0010]

<400> 18

Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser

1 5 10 15

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu  
20 25 30

Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn  
35 40 45

Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr  
50 55 60

Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln  
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu  
85 90 95

Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu  
100 105 110

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu

115 120 125

Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln  
 130 135 140

Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu  
 145 150 155 160

Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys  
 165 170 175

Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln  
 180 185 190

His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile  
 195 200 205

Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg  
 210 215 220

[0011] Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp  
 225 230 235 240

Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr  
 245 250 255

Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val  
 260 265 270

Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg  
 275 280 285

Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr  
 290 295 300

Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile  
 305 310 315 320

Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu  
 325 330 335

Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly  
 340 345 350

Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn  
 355 360 365

Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp  
 370 375 380

Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly  
 385 390 395 400

Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys  
 405 410 415

Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu  
 420 425 430

Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys  
 435 440 445

Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu  
 450 455 460

[0012]

<210> 19  
 <211> 198  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19  
 Met Pro Val Pro Ala Leu Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Val Thr  
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Ser Ala Ala Pro Met Gly Gly Pro Glu Leu Ala Gln His  
 20 25 30

Glu Glu Leu Thr Leu Leu Phe His Gly Thr Leu Gln Leu Gly Gln Ala  
 35 40 45

Leu Asn Gly Val Tyr Arg Thr Thr Glu Gly Arg Leu Thr Lys Ala Arg  
 50 55 60

Asn Ser Leu Gly Leu Tyr Gly Arg Thr Ile Glu Leu Leu Gly Gln Glu  
 65 70 75 80

Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg Ala Ser Leu Leu  
 85 90 95

Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln Ala Glu Ala Thr  
100 105 110

Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys Val Leu Arg Asp  
115 120 125

Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala Trp Leu Gly Pro  
130 135 140

[0013] Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala Asp Lys Gln Ser  
145 150 155 160

His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg Gln Arg Arg Glu  
165 170 175

Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln Glu Arg Leu His  
180 185 190

Thr Ala Ala Leu Pro Ala  
195

## 甘油三酯

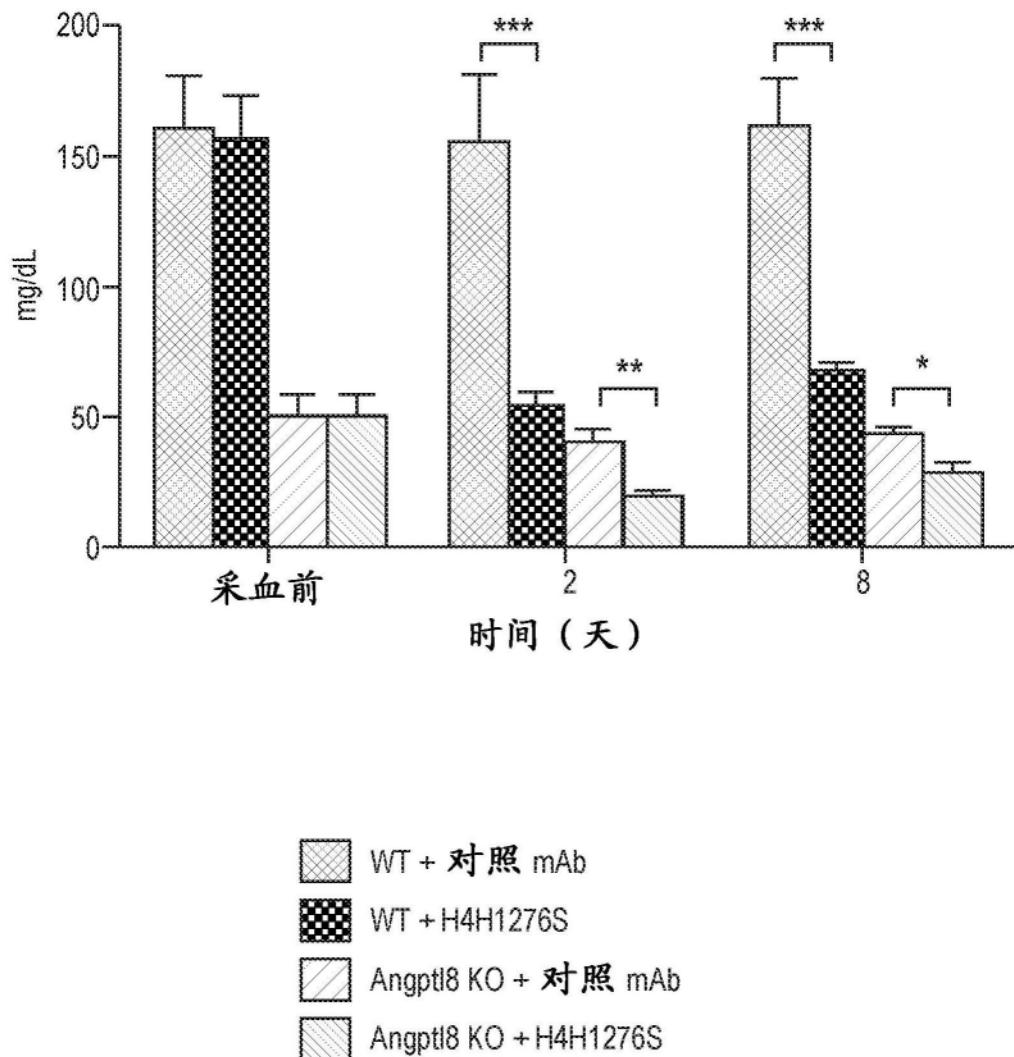


图1

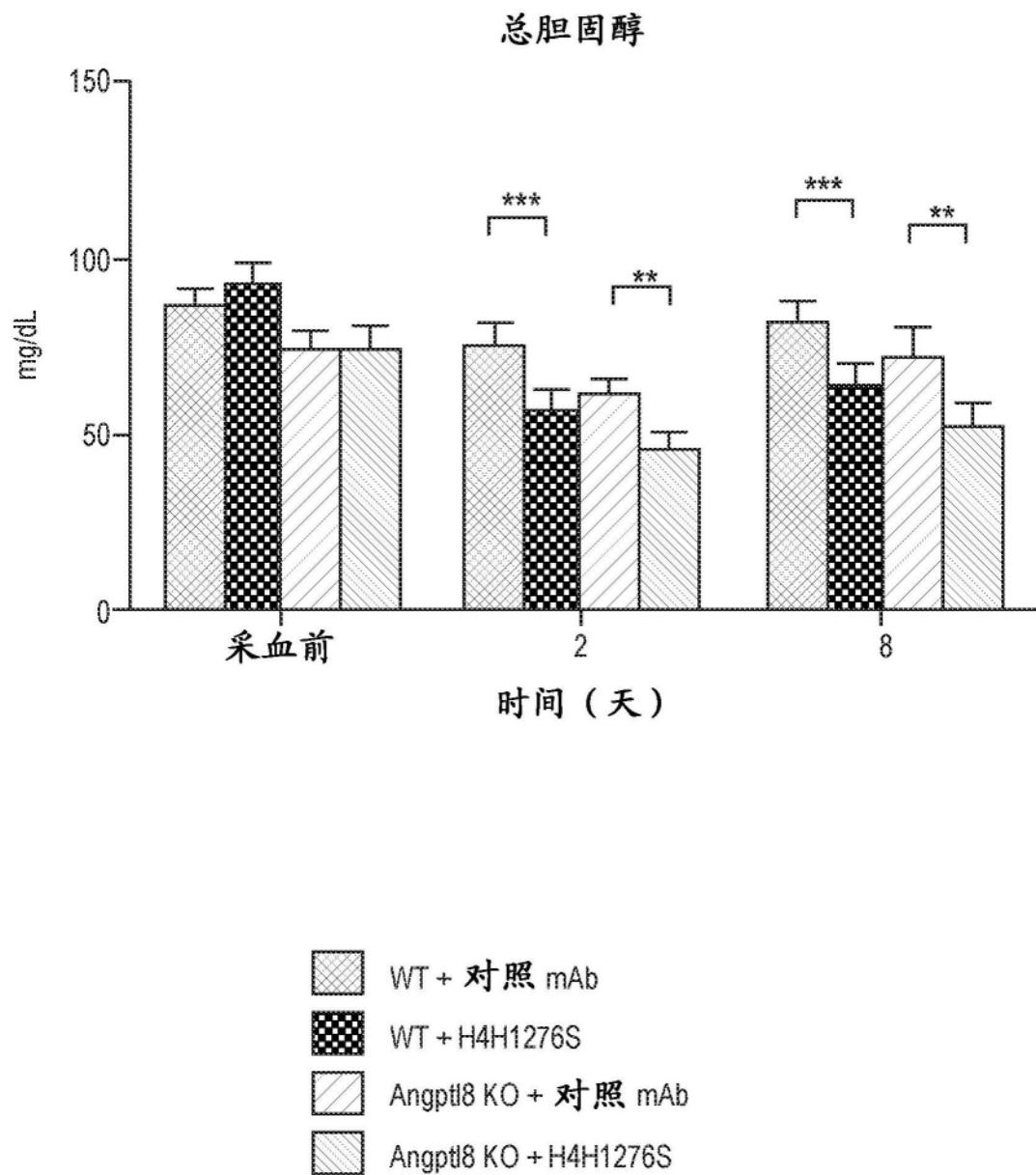


图2

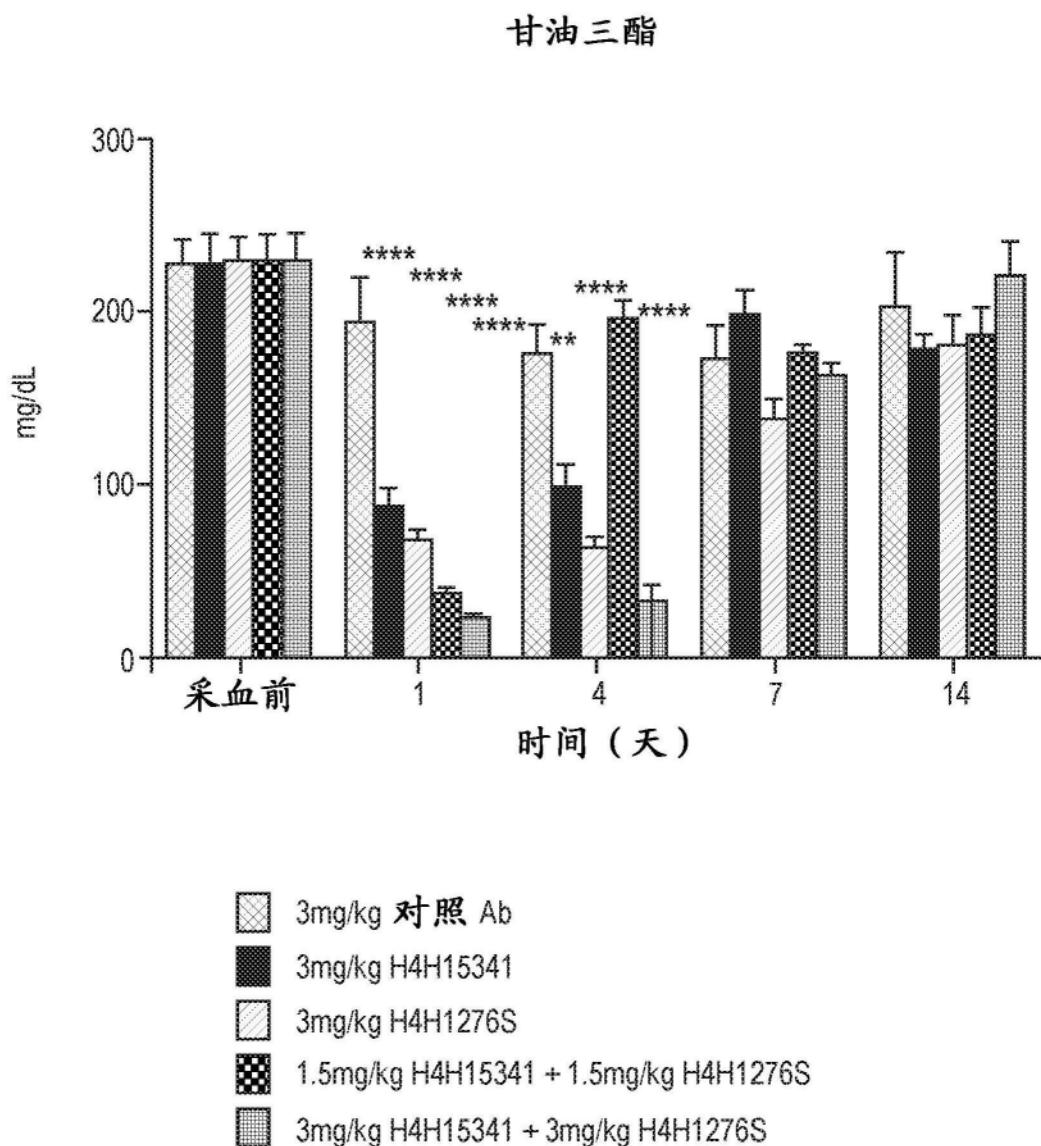


图3

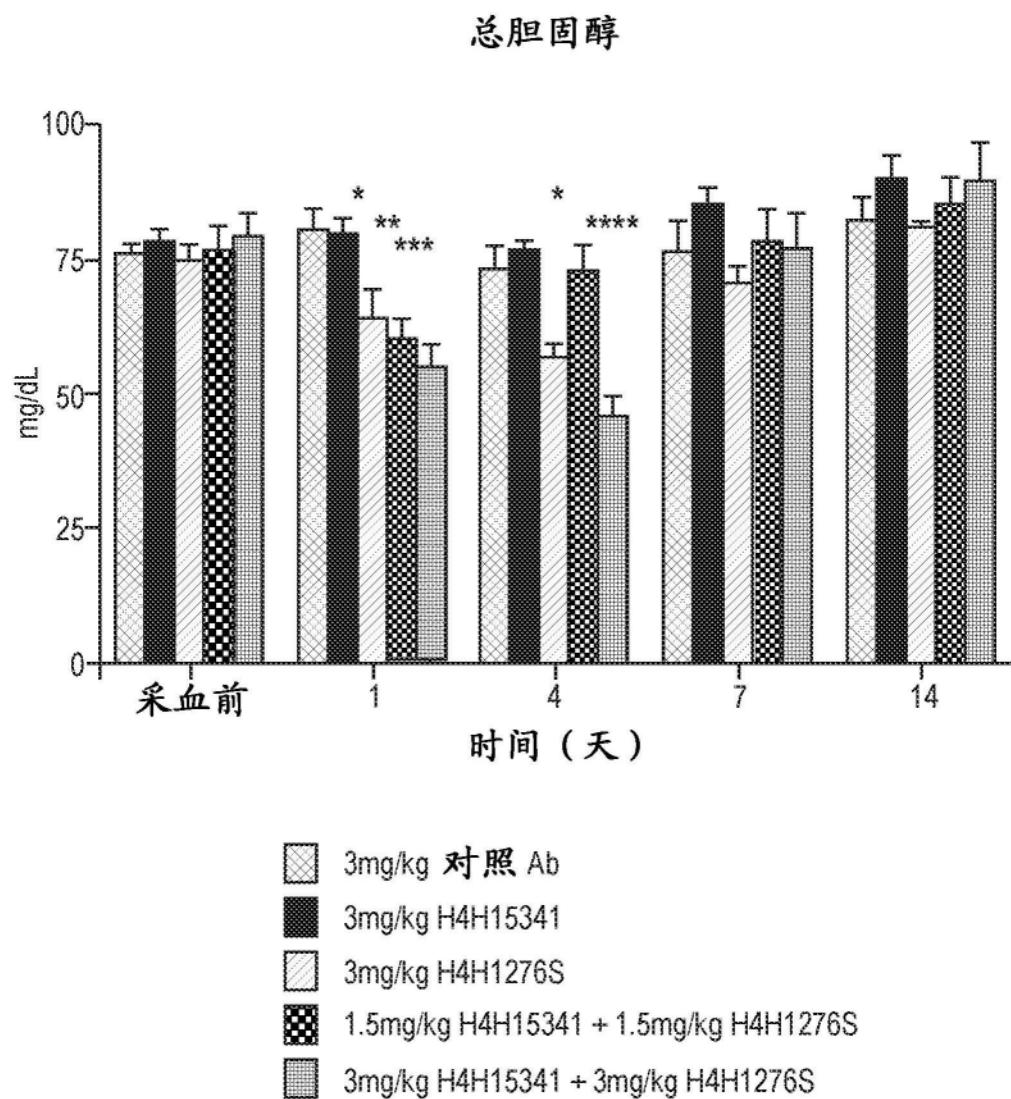


图4

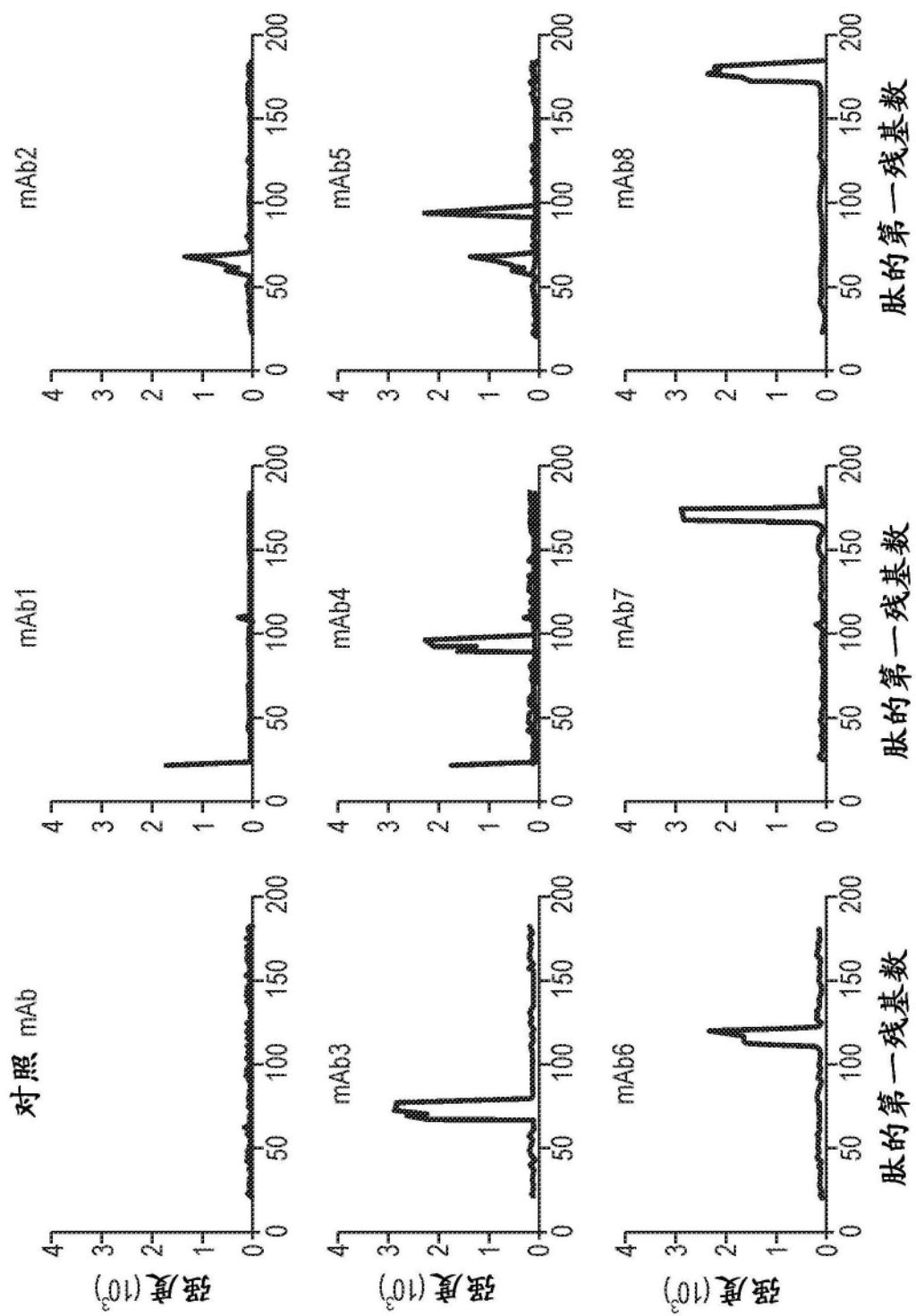


图5

		mAb1		
1	MPVPALCLLW ALAMVTRPAS A <u>APMGGPELA QHEELT</u> LLFH GTLQLGQALN	信号序列	抑制基序	
		mAb2	mAb3	mAb4
51	G VYRTTEGRL TKARNNSL <u>GLY</u> GRTIELLIGQE VSRGRDAAQE LRAS <u>LL</u> ETQM			
		mAb5	mAb6	
101	<u>EEDILQLQAE</u> ATAEVLGEVA Q <u>AQKVLRD</u> SV QRLEVQLRSA WLGPAYREFE			
		mAb7	mAb8	
151	VLKAHADKQS HILWALTGHV Q <u>RQRREMVA</u> Q <u>QHRLRQI</u> QER LHTAAALPA			

图 6a

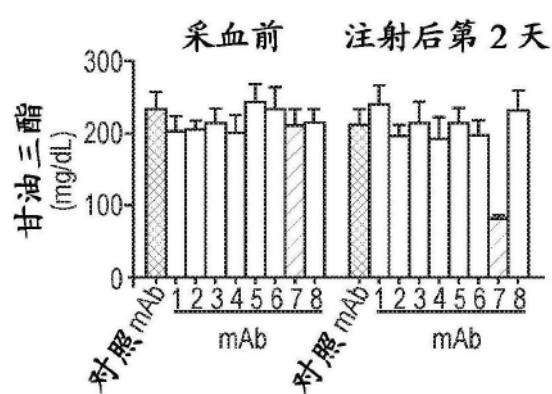


图6b

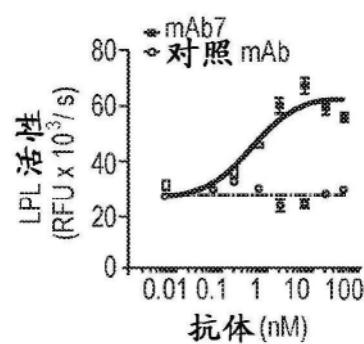


图6c

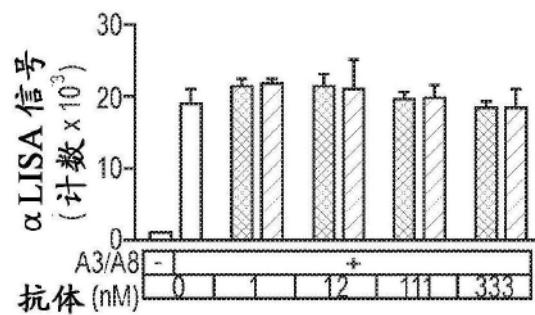


图6d

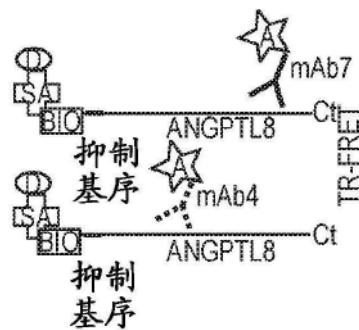


图6e

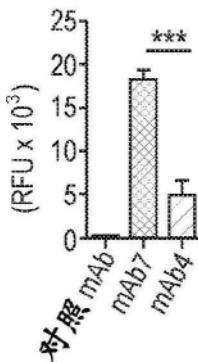


图6f