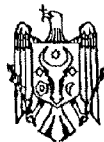




MD/EP 3439689 T2 2021.12.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3439689 (13) T2

(51) Int. Cl.:A61K 39/00 (2006.01.01)

A61P 3/06 (2006.01.01)

C07K 16/22 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0190	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2021, 2021.12.31
(22) Data de depozit: 2017.04.07	
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17719107.9, 2017.04.07	(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 41/2021, 2021.10.13
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3439689, 2019.02.13	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2019, 2019.03.31
(31) Numărul cererii prioritare: 201662319980 P; 201762453110 P	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.04.08; 2017.02.01	
(33) Țara cererii prioritare: US; US	
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US	
(72) Inventatori: GROMADA Jesper, US; GUSAROVA Viktoria, US; MURPHY Andrew J., US	
(73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US	
(74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Metode de tratament al hiperlipidemieii cu un inhibitor al ANGPTL8 și un inhibitor al ANGPTL3

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la metode pentru tratarea pacienților care suferă de hiperlipidemie, în care pacientul nu răspunde la terapia standard care modifică lipidele, este controlată inadecvat sau este intolerantă la asemenea tratament. Metodele invenției asigură reducerea, cel puțin, a unui parametru lipidic la pacient prin administrarea unei cantități terapeutice eficiente de un anticorp sau de un fragment de legare la antigen al acestuia,

2

care se leagă în mod specific la proteina 8 asemănătoare angiopoietinei (ANGPTL8) în combinație cu o cantitate terapeutic eficientă de un anticorp care se leagă în mod specific la proteina 3 asemănătoare angiopoietinei (ANGPTL3). Combinația unui anticorp anti-ANGPTL8 cu un anticorp anti-ANGPTL3 este utilă în tratarea unor așa boli, cum ar fi hipercolesterolemia, inclusiv hipercolesterolemia familială (FH), atât heFH

MD/EP 3439689 T2 2021.12.31

cat și hoFH, precum și hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia și dislipidemia, inclusiv hipertrigliceridemia, chilomicronemia și pentru a preveni sau trata boli sau tulburări, pentru care metabolismul anormal al lipidelor este un factor de risc, cum ar fi bolile cardiovasculare.

Secvențe: 19

Revendicări: 10

Figuri: 6

(54) Methods for treating hyperlipidemia with an angptl8 inhibitor and an angptl3 inhibitor

(57) Abstract:

1

The present invention provides methods for treating patients suffering from hyperlipidemia, wherein the patient is non-responsive to, inadequately controlled by, or intolerant to treatment with a standard lipid modifying therapy. The methods of the invention provide for lowering at least one lipid parameter in the patient by administering a therapeutically effective amount of an antibody or antigen-binding fragment thereof that specifically binds to angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) in combination with a therapeutically effective amount of an antibody that specifically binds to angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3). The combination of an anti-ANGPTL8 antibody with an anti-ANGPTL3 antibody is useful in treating diseases such as hypercholesterolemia, including familial hypercholesterolemia (FH),

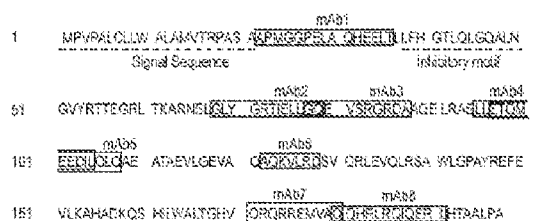
2

both heFH and hoFH, as well as hyperlipidemia, hyperlipoproteinemia and dyslipidemia, including hypertriglyceridemia, chylomicronemia, and to prevent or treat diseases or disorders, for which abnormal lipid metabolism is a risk factor, such as cardiovascular diseases.

Sequences: 19

Claims: 10

Fig.: 6



Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

5 Prezența invenției se referă la domeniul tratamentelor terapeutice ale bolilor și tulburărilor, care sunt asociate cu niveluri crescute de lipide și lipoproteine. Mai specific, invenția se referă la utilizarea unui inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) în combinație cu un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3) pentru a trata pacienții cu hipercolesterolemie și afecțiuni conexe.

FUNDAL

10 Hiperlipidemia este un termen general care cuprinde boli și tulburări caracterizată prin sau asociată cu niveluri crescute de lipide și / sau lipoproteine din sânge. Hiperlipidemiile includ hipercolesterolemie, hipertrigliceridemie, hiperlipidemie combinată și lipoproteină crescută a (Lp (a)). O formă specială predominantă de hiperlipidemie la multe populații este hipercolesterolemia.

15 Hipercolesterolemia, în special o creștere a nivelului de colesterol cu lipoproteine cu densitate mică (LDL) (LDL-C), constituie un risc major pentru dezvoltarea aterosclerozei și a bolilor coronariene (CHD) (Sharrett și colab., 2001, Circulation 104: 1 108 -1 1 13). Colesterolul cu lipoproteine cu densitate scăzută este identificat ca ținta principală a terapiei de scădere a colesterolului și este acceptat ca obiectiv terapeutic valid surogat. Numeroase studii au demonstrat că reducerea nivelului LDL-C reduce riscul de CHD cu o relație directă puternică între nivelurile LDL-C și evenimentele CHD; pentru fiecare 1 mmol / L (-40 mg / dL) reducerea LDL-C, mortalitatea și morbiditatea bolilor cardiovasculare (BCV) este redusă cu 22%. Reduceri mai mari ale LDL-C produc o reducere mai mare a evenimentelor, iar datele comparative ale tratamentului intensiv cu statine standard sugerează că, cu cât nivelul LDL-C este mai mic, cu atât este mai mare beneficiul la pacienții cu risc cardiovascular foarte mare (CV).

25 Hipercolesterolemia familială (FH) este o tulburare moștenită a metabolismului lipidic care predispune o persoană la boli cardiovasculare severe premature (BCV) (Kolansky și colab., (2008), Am J Cardiology, 102 (1 1): 1438-1443). FH poate fi fie o boală autosomală dominantă, fie o boală autosomală recesivă care rezultă din mutații ale receptorului de lipoproteine cu densitate mică (LDLR), sau în cel puțin 3 gene diferite care codifică proteinele implicate în clearance-ul hepatic al LDL-C poate provoca FH. Exemple de astfel de defecte includ mutații în gena care codifică receptorul LDL (LDLR) care elimină LDL-C din circulație și în gena pentru apolipoproteina (Apo) B, care este proteina majoră a particulei LDL. În toate cazurile, FH se caracterizează printr-o acumulare de LDL-C în plasmă de la naștere și dezvoltarea ulterioară a xantomelor tendinoase, xanthelasmae, ateromate și BCV. FH poate fi clasificat fie ca FH heterozigot (heFH), fie ca FH homozigot (hoFH), în funcție de faptul dacă individul are un defect genetic într-una (heterozigotă) sau ambele (homozigote) copii ale genei implicate.

35 Medicamentele actuale care scad LDL-C includ statine, inhibitori ai absorbției colesterolului, fibrate, niacină și secheștranti ai acidului biliar. Statinele sunt un tratament prescris în mod obișnuit pentru scăderea LDL-C. Cu toate acestea, în ciuda disponibilității unor astfel de terapii de scădere a lipidelor, mulți pacienți cu risc crescut nu reușesc să-și atingă nivelul țintă LDL-C țintă (Gitt și colab., 2010, Clin Res Cardiol 99 (1 1): 723-733). Pentru pacienții care încă nu pot atinge nivelul țintă orientativ pentru LDL-C, în ciuda terapiei de modificare a lipidelor (LMT), este uneori prescrisă îndepărtarea mecanică a LDL-C prin afereza lipoproteicelor (de exemplu, afereza LDL).

45 Cu toate acestea, pacienții care nu au obiectivul LDL-C în ciuda faptului că au primit un regim optimizat de LMT, ar beneficia foarte mult de terapii alternative de scădere a LDL-C sau prin utilizarea unei combinații de agenți terapeutici, cum ar fi agenții și regimurile descrise aici.

50 Fu și alții (2015) Scientific Reports, 5, 1-9 dezvăluie generația de 5 anticorpi lipasin monoclonali, printre care unul care a redus nivelul trigliceridelor serice atunci când a fost injectat la șoareci. Zhang (2016) Open biology, 6, 150272 revizuieste modelul ANGPTL3-4-8 ca un mecanism molecular pentru traficul trigliceridelor.

SCURT REZUMAT AL INVENȚIEI

55 Prezența invenției prevede o cantitate eficientă terapeutic dintr-un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) pentru a fi utilizat într-o metodă de tratare a unui pacient cu hiperlipidemie în combinație cu o cantitate eficientă terapeutic dintr-un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3). Prezența invenției prevede de asemenea o cantitate eficientă terapeutic dintr-un inhibitor al ANGPTL3 pentru utilizare într-o metodă de

tratare a unui pacient cu hiperlipidemie în combinație cu o cantitate eficientă terapeutică dintr-un inhibitor al ANGPTL8

Intr-o variantă de realizare, hiperlipidemia este hiperlipidemia familială sau hiperlipidemia dobândită.

5 Intr-un exemplu de realizare, hiperlipidemia este selectată din grupul constând din hiperlipoproteinemie, hipercolesterolemie, hipertrigliceridemie sau hiperlipomicroemie.

Intr-o variantă de realizare, hiperlipidemia familială este hipercolesterolemia selectată din grupul constând în hipercolesterolemie familială heterozigotă (HeFH) și hipercolesterolemie familială homozigotă (HoFH).

10 Intr-un exemplu de realizare, hiperlipidemia dobândită este rezultatul consumului excesiv de alcool, obezității, efectelor secundare ale medicamentelor (de exemplu, hormoni sau steroizi), diabet, boli de rinichi, glanda tiroidă subactivă sau sarcină.

În invenție, inhibitorul ANGPTL8 este un anticorp sau un fragment al acestuia care leagă antigenul, care se leagă în mod specific la ANGPTL8.

15 Intr-un aspect al dezvoltării, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde regiunile de determinare a complementarității (CDR) ale unei variabile a lanțului greu (HCVR) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 1 și CDR-urile unui regiunea variabilă a lanțului ușor (LCVR) din SECV ID NR: 5.

20 În invenție, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 2, un HCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3, a HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 6, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 7 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 8.

25 Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde un HCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 1 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5.

Intr-o variantă de realizare, anticorpul ANGPTL8 este administrat pacientului subcutanat sau intravenos.

30 Intr-o variantă de realizare, inhibitorul ANGPTL3 este un anticorp sau un fragment al acestuia care leagă antigenul, care se leagă în mod specific la ANGPTL3.

Intr-o variantă, anticorpul ANGPTL3 este evinacumab.

35 Intr-un aspect al dezvoltării, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde regiunile de determinare a complementarității (CDR) ale unei variabile a lanțului greu (HCVR) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 10 și CDR-urile unui regiunea variabilă a lanțului ușor (LCVR) din SECV ID NR: 14.

40 În invenție, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 11, un HCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 12, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 13, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 16, și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 17.

45 Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde un HCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 10 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14.

Intr-o variantă de realizare, anticorpul ANGPTL3 este administrat pacientului subcutanat sau intravenos.

50 Invenția prevede de asemenea metode de reducere a nivelului a cel puțin unui parametru lipidic la un pacient care suferă de o tulburare sau afecțiune caracterizată parțial de niveluri crescute de lipide sau lipoproteine, metoda cuprinzând administrarea la pacient a unui efect terapeutic eficient. cantitate dintr-o combinație de inhibitor de proteină asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) și un inhibitor de proteină asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3).

55 Intr-un aspect, tulburarea sau starea este hiperlipidemie selectată din grupul constând din hiperlipidemie familială și hiperlipidemie dobândită.

Intr-un aspect, tulburarea sau starea este hiperlipidemia selectată din grupul constând din hiperlipoproteinemie, hipercolesterolemie, hipertrigliceridemie sau hiperlipomicroemie.

60 Intr-un aspect, hiperlipidemia familială este hipercolesterolemia selectată din grupul constând din hipercolesterolemie familială heterozigotă (HeFH) și hipercolesterolemie familială homozigotă (HoFH).

Intr-un aspect, hiperlipidemia dobândită este rezultatul consumului excesiv de alcool, obezității, efectelor secundare ale medicamentelor (de exemplu, hormoni sau steroizi), diabet, boli de rinichi, glanda tiroidă subactivă sau sarcină.

5 Intr-un aspect, hipertrigliceridemia tratabilă prin metodele invenției include hiperlipidemie combinată familială, disbetalipoproteinemie familială, familială hipertrigliceridemie, chilomicronemie severă și deficit familial de lipoproteine lipază.

Intr-un aspect, inhibitorul ANGPTL8 este un anticorp sau un fragment al acestuia care leagă antigenul, care se leagă în mod specific la ANGPTL8.

10 Intr-un aspect, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde regiunile de determinare a complementarității (CDR) ale unei variabile a lanțului greu (HCVR) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 1 și CDR-urile unui regiunea variabilă a lanțului ușor (LCVR) din SECV ID NR: 5.

15 Intr-un aspect, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 2, un HCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3, a HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 6, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 7 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 8.

20 Intr-un aspect, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde un HCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 1 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5.

Intr-un aspect, anticorpul ANGPTL8 este administrat pacientului subcutanat sau intravenos.

Intr-un aspect, inhibitorul ANGPTL3 este un anticorp sau un fragment al acestuia care leagă antigenul, care se leagă în mod specific la ANGPTL3.

25 Intr-un aspect, anticorpul ANGPTL3 este evinacumab.

Intr-un aspect, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde regiunile de determinare a complementarității (CDR) ale unei variabile a lanțului greu (HCVR) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 10 și CDR-urile unui regiunea variabilă a lanțului ușor (LCVR) din SECV ID NR: 14.

30 Intr-un aspect, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 11, un HCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 12, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 13, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 16, și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 17.

Intr-un aspect, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde un HCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 10 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14.

Intr-un aspect, anticorpul ANGPTL3 este administrat pacientului subcutanat sau intravenos.

40 Intr-o variantă de realizare a invenției, inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3 sunt administrați concomitent sau secvențial.

Intr-o variantă de realizare a invenției, inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3 sunt administrați la concentrații eficiente terapeutic în compoziții farmaceutice separate sau sunt formulate într-o singură compoziție farmaceutică.

45 În unele variante de realizare invenția se referă la tratarea hiperlipidemiei la pacienții care nu răspund la, controlați inadecvat de sau sunt intoleranți la tratamentul cu o terapie standard de modificare a lipidelor. Metodele terapeutice au ca rezultat o scădere a nivelurilor serice de lipoproteine la un interval normal și acceptabil și, ca atare, pot acționa pentru a reduce riscul de apariție a aterosclerozei sau a bolilor coronariene.

50 Intr-o variantă de realizare, invenția oferă o metodă de tratare a unui pacient care suferă de hipercolesterolemie, în care pacientul nu răspunde la, nu este controlat adecvat sau este intolerant la tratamentul cu o terapie standard de modificare a lipidelor, metoda care cuprinde tratarea pacientului cu o combinație a unui inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) și a unui inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3).

55 Intr-o variantă de realizare, invenția prevede administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor ANGPTL8 în combinație cu una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3 unui pacient care este tratat sau a fost tratat cu o terapie standard de modificare a lipidelor, dar nu a răspuns la o astfel de terapie. Administrarea unei combinații a unui inhibitor ANGPTL8 cu un inhibitor ANGPTL3 la pacient are ca rezultat scăderea nivelului a cel puțin unei lipoproteine din serul pacientului și, prin urmare, reduce sau elimină necesitatea tratamentului cu terapia standard de scădere a lipidelor de către pacient.

Invenția poate cuprinde selectarea unui pacient cu hipercolesterolemie care este tratat sau a fost tratat cu o terapie standard de scădere a lipidelor și care nu este receptiv, controlat inadecvat de sau este intolerant la o astfel de terapie și administrarea uneia sau mai multor doze de anticorp ANGPTL8 în combinație cu una sau mai multe doze de anticorp ANGPTL3 la pacient, scăzând astfel nivelul a cel puțin unei lipoproteine din serul pacientului și în consecință înlocuind utilizarea modificării standard a lipidelor terapie cu terapia combinată a unui anticorp ANGPTL8 plus un anticorp ANGPTL3 pentru a atinge un nivel țintă de lipoproteine.

Pacienții care sunt tratați sau tratabili prin metodele prezentei invenții includ, de exemplu, pacienți cu hipercolesterolemie, inclusiv pacienți cu hipercolesterolemie familială (FH). În anumite variante de realizare, pacienții care sunt tratați sau tratabili prin metodele prezentei invenții sunt pacienți cărora li se diagnostichează (sau se știe că au), FH homozigot (hoFH) sau FH heterozigot (heFH) sau cu risc de dezvoltare anormală, niveluri ridicate de lipide și / sau lipoproteine asociate cu FH homozigot (hoFH) sau FH heterozigot (heFH).

Prezenta invenție oferă, de asemenea, compoziții farmaceutice cuprinzând un inhibitor ANGPTL8 și un inhibitor ANGPTL3 pentru utilizare în tratarea unui pacient care nu răspunde la, controlat inadecvat de sau este intolerant la tratamentul cu o terapie standard de modificare a lipidelor, cum ar fi o statină. Statina poate fi selectată din grupul format din atorvastatină (LIPITOR®), pitavastatină (LIVALO®), lovastatină (MEVACOR®), simvastatină (ZOCOR®), pravastatină (PRAVACHOL®) fluvastatină (LESCOL®) și rosuvastatină (CRESTOR®). Alți agenți standard de scădere a lipidelor care pot fi utilizați la pacienții care suferă de hipercolesterolemie includ, dar nu se limitează la, fibrate, niacină, secheștranti ai acidului biliar, ezetimib (ZETIA®), lomitapidă (JUXTAPID®), fitosteroli, orlistat (XENICAL®).

[0049] Exemple de inhibitori ANGPTL8 sau inhibitori ANGPTL3 care pot fi utilizați în contextul metodelor prezentei invenții includ, de exemplu, anticorpi anti-ANGPTL8 sau anti-ANGPTL3, inhibitori de molecule mici și pe bază de schele, adică molecule care leagă ANGPTL8 sau molecule care leagă ANGPTL3.

În anumite variante de realizare, se prevede că utilizarea combinației dintre Inhibitorul ANGPTL8 cu inhibitorul ANGPTL3 poate fi suficient de eficient la scăderea nivelului seric al lipidelor și / sau lipoproteinelor, astfel încât doza tratamentului standard de modificare a lipidelor poate fi redusă pentru a elimina orice efect nefavorabil sau poate fi eliminată cu totul.

În invenție, administrarea anticorpului ANGPTL8 în combinație cu anticorpul ANGPTL3 are ca rezultat un efect aditiv asupra scăderii nivelului sanguin al trigliceridelor și al colesterolului total.

Intr-un aspect al dezvoltării, administrarea anticorpului ANGPTL8 în combinație cu anticorpul ANGPTL3 are ca rezultat un efect sinergic asupra scăderii nivelului sanguin al trigliceridelor și al colesterolului total.

Administrarea anticorpului ANGPTL8 în combinație cu anticorpul ANGPTL3 are ca rezultat scăderea unuia sau mai multora dintre următorii parametri:

(a) o reducere a nivelului seric al colesterolului total (TC); sau

(b) o reducere a trigliceridelor serice (TG);

în care reducerea (a) și / sau (b) sunt determinate în raport cu nivelul seric al TC al pacientului sau cu nivelurile serice ale trigliceridelor înainte sau în momentul inițierii tratamentului cu combinația inhibitorului ANGPTL8 și a inhibitorului ANGPTL3.

Intr-o variantă de realizare, invenția este direcționată către o compoziție farmaceutică pentru tratarea unui pacient care suferă de hiperlipidemie, în care compoziția cuprinde o cantitate eficientă terapeutică a unei combinații a unui inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) așa cum este definit în revendicări cu un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3) așa cum este definit în revendicări. Alte variante ale prezentei invenții vor deveni evidente dintr-o revizuire a descrierii detaliate care urmează.

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 prezintă efectul H4H1276S (denumit și evinacumab), un anticorp anti-ANGPTL3, asupra nivelurilor de trigliceride la șoareci ANGPTL8 knockout (KO) sau la șoareci de tip sălbatic (WT) în ziua 2 sau 8 după administrare.

Figura 2 prezintă efectul H4H1276S asupra nivelului total de colesterol la șoareci knockout ANGPTL8 sau la șoareci de tip sălbatic în ziua 2 sau 8 după administrare.

Figura 3 prezintă efectul H4H1276S și H4H15341 P (denumit și H4H15341 ", un anticorp anti-ANGPTL8) la nivelurile trigliceridelor la șoarecii ANGPTL8 umanizați în zilele 1, 4, 7 și 14 după administrare.

Figura 4 prezintă efectul H4H1276S și H4H15341 P (un anticorp anti-ANGPTL8) asupra nivelului total de colesterol la șoarecii ANGPTL8 umanizați în zilele 1, 4, 7 și 14 după administrare.

Figura 5 prezintă rezultatele cartografierii epitopului anticorpilor monoclonali anti-ANGPTL8: PEPSCAN ELISA a fost efectuat pentru a examina legarea anticorpilor anti-ANGPTL8 de peptidele lungi de 15 aminoacizi cu 14 aminoacizi suprapuse, acoperind ANGPTL8 matur.

- 5 Figurile 6a, 6b, 6c, 6d, 6e și 6f prezintă inversarea anticorpilor ANGPTL8 ANGPTL3: inhibarea LPL mediată de ANGPTL8 prin interferența sterică a LPL cu motivul inhibitor al ANGPTL8. (Figura 6a) Secvența de aminoacizi ANGPTL8 (SECV ID NR: 19) care prezintă epitopi a opt anticorpi monoclonali crescuți împotriva ANGPTL8 umană. (Figura 6b) trigliceridele serice ale șoarecilor ANGPTL8 umanizați, cu 7 zile înainte (pre-sangerare) și la 2 zile după o
10 singură injecție de 10 mg / ml din cei opt anticorpi monoclonali cu epitopi arătați în (Figura 6a). (Figura 6c) Activitatea LPL măsurată în mediul celular din celulele HEK283T co-transfectate cu ANGPTL3 și ANGPTL8 au fost tratate cu concentrație crescută de anticorp blocant anti-ANGPTL8 (mAb7) sau anticorp de control. (Figura 6d) Test AlphaLISA pentru a determina interacțiunea dintre ANGPTL3 și ANGPTL8 co-exprimate în celule CHO-K1 fără concentrații sau
15 crescând, fie de anticorp blocant anti-ANGPTL8 (mAb7), fie de anticorp martor. (Figura 6e) Schema testului TR-FRET cu colorant donator la capătul N-terminal al ANGPTL8, lângă motivul său inhibitor, și anticorpi blocanți și neblocați marcați cu colorant acceptor. (Figura 6f) Transferul de energie măsurat prin testul TR-FRET între capătul N-terminal marcat ANGPTL8 și anticorpul de control, anticorpul blocant anti-ANGPTL8 (mAb7) sau anti-ANGPTL8 non-blocant (mAb4) ($n = 3$; *** $p < 0,0001$). Experimentul a fost repetat de 3 ori cu rezultatul similar. Abrevieri: Bio, biotină; SA, streptavidină, imAb, anticorp monoclonal; D, colorant donator; A, vopsea acceptor.

DESCRIEREA DETALIATA

- Inainte ca prezenta invenție să fie descrisă, trebuie înțeles că această invenție nu se limitează la metode particulare și condiții experimentale descrise, deoarece astfel de metode și
25 condiții pot varia. De asemenea, trebuie să se înțeleagă că terminologia utilizată aici are scopul de a descrie numai exemple de realizare particulare și nu este destinată a fi limitativă, deoarece scopul prezentei invenții va fi limitat doar de revendicările anexate.

- Cu excepția cazului în care este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțelege în mod obișnuit un specialist în domeniu cărui îi aparține această invenție. Așa cum este utilizat aici, termenul "aproximativ", atunci când este
30 utilizat în referință la o anumită valoare numerică recitată, înseamnă că valoarea poate varia de la valoarea recitată cu cel mult 1%. De exemplu, așa cum este utilizat aici, expresia „aproximativ 100” include 99 și 101 și toate valorile între ele (de exemplu, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 etc.).

- Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate
35 în practica prezentei invenții, metodele și materialele preferate sunt acum descrise. Toate publicațiile menționate aici sunt încorporate aici prin referință pentru a le descrie în întregime.

Metode pentru tratarea hiperlipidemiilor

- Prezenta invenție se referă în general la metode și compoziții pentru reducerea nivelurilor de lipoproteine, în special a trigliceridelor și a colesterolului total, la pacienții care suferă de
40 hiperlipidemie, prin administrarea unei combinații a unui inhibitor de ANGPTL8 cu un inhibitor de ANGPTL3 unui pacient care are nevoie de o astfel de terapie. În anumite variante de realizare, combinația de inhibitori este utilizată pentru a trata hipercolesterolemia sau hipertrigliceridemia, la pacienții care nu răspund, sunt controlați în mod inadecvat sau sunt intoleranți la terapiile standard de modificare a lipidelor (de exemplu, o statină). În anumite variante ale invenției, tratamentul cu
45 un inhibitor ANGPTL8 în combinație cu un inhibitor ANGPTL3 poate servi la scăderea nivelurilor de lipoproteine la acești pacienți la un interval acceptabil, scăzând astfel riscul lor de apariție a aterosclerozei, accidentului vascular cerebral și a altor boli cardiovasculare. În anumite variante de realizare, metodele descrise pot fi utilizate pentru a trata pacienții care suferă de hipercolesterolemie, incluzând hipercolesterolemia familială heterozigotă (heFH) și / sau hipercolesterolemia familială homozigotă (hoFH), în cazul în care acești pacienți nu răspund, sunt controlați inadecvat de, sau intolerant la terapiile standard de modificare a lipidelor. În anumite
50 variante de realizare, metodele descrise pot fi utilizate pentru a trata pacienții care suferă sau prezintă risc de apariție a aterosclerozei, a bolii coronariene, a diabetului, a obezității, a pancreatitei sau a sindromului metabolic.

- Așa cum este utilizat aici, termenul "lipoproteină" înseamnă o particulă biomoleculară care conține atât proteine, cât și lipide. Exemple de lipoproteine includ, de exemplu, lipoproteine cu densitate mică (LDL), lipoproteine cu densitate mare (HDL), lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL), lipoproteine cu densitate intermediară (IDL) și lipoproteine (a) (Lp (a)).

- Prezenta invenție, conform anumitor exemple de realizare, include metode pentru tratarea
60 pacienților care nu răspund la, sunt controlați în mod inadecvat sau sunt intoleranți la terapia standard de modificare a lipidelor. Așa cum se folosește aici, un anumit pacient care „nu răspunde

la, nu este controlat în mod adecvat sau este intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor” este determinat de un medic, asistentul medicului, medicul de diagnosticare sau alt profesionist medical pe baza nivelului de una sau mai multe lipoproteine (de exemplu, LDL-C și / sau non-HDL-C) măsurate sau altfel detectate în serul pacientului după tratamentul cu agentul modificador standard de lipide. Medicul, asistentul medicului, diagnosticul sau alt profesionist medical poate determina, de asemenea, dacă pacientul este intolerant la terapiile standard de modificare a lipidelor pe baza profilului de efect secundar al terapiilor standard de modificare a lipidelor, pe care pacientul le poate experimenta, inclusiv, dar nu limitat la , dureri musculare, sensibilitate sau slăbiciune (mialgie), cefalee, înroșirea pielii, dificultăți de somn, crampe abdominale, balonare, diaree, constipație, erupție cutanată, greață sau vărsături. Un pacient care nu răspunde la, nu este controlat în mod adecvat de sau este intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor poate fi, de asemenea, determinat sau influențat de alți factori, cum ar fi istoricul familial al pacientului, antecedentele medicale, starea curentă a tratamentului terapeutic, precum și general acceptat sau ținte predominante de lipoproteine adoptate de asociațiile medicale naționale și grupurile de medici. De exemplu, în anumite contexte, dacă un pacient este supus tratamentului cu un agent standard de modificare a lipidelor și prezintă un nivel LDL-C mai mare sau egal cu aproximativ 70 mg / dL, acest lucru indică faptul că pacientul este „neacceptabil la , sau controlat inadecvat de, sau intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor ”și poate beneficia de tratament folosind terapiile descrise aici. În alte contexte, dacă un pacient este supus terapiei cu un agent de modificare a lipidelor standard și prezintă un nivel LDL-C mai mare sau egal cu aproximativ 100 mg / dL, acest lucru indică faptul că pacientul este „neacceptabil, controlat inadecvat de, sau intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor ”și poate beneficia de tratament folosind terapiile descrise aici. În anumite contexte, dacă un pacient este supus tratamentului cu un agent standard de modificare a lipidelor și prezintă un nivel LDL-C mai mare sau egal cu aproximativ 150 mg / dL, 200 mg / dL, 250 mg / dL, 300 mg / dL , 400 mg / dL sau mai mare, acest lucru indică faptul că pacientul este "neacceptabil, controlat inadecvat de, sau intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor" și poate beneficia de tratament folosind terapiile descrise aici. În alte contexte, indiferent dacă este îndeplinită sau nu o anumită reducere procentuală a nivelului LDL-C sau non-HDL-C, în raport cu nivelul LDL-C sau non-HDL-C al pacientului la un anumit punct de pornire („linia de bază”) poate fi utilizat pentru a determina dacă pacientul a răspuns la terapia standard de modificare a lipidelor sau dacă pacientul respectiv are nevoie de un tratament suplimentar folosind metodele și agenții prezentei invenții. De exemplu, o reducere a LDL-C sau non-HDL-C de mai puțin de 50% (de exemplu, mai puțin de 40%, mai puțin de 35%, mai puțin de 30%, mai puțin de 25% etc.) de la momentul inițial poate însemna o nevoie de terapie folosind metodele și agenții invenției.

[0062] De exemplu, în anumite contexte, dacă un pacient este supus tratamentului cu un agent standard de modificare a lipidelor și prezintă un nivel de trigliceridă (TG) mai mare sau egal cu aproximativ 150 mg/dL, acest lucru indică faptul că pacientul este „nu răspunde la, sau inadecvat controlat de, sau intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor” și poate beneficia de tratament folosind terapiile descrise aici. În alte contexte, dacă un pacient este supus terapiei cu un agent standard de modificare a lipidelor și prezintă un nivel de TG mai mare sau egal cu aproximativ 200 mg/dL, acest lucru indică faptul că pacientul "nu răspunde la, controlat inadecvat de, sau intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor ”și poate beneficia de tratament folosind terapiile descrise aici. În anumite contexte, dacă un pacient urmează un tratament cu un agent de modificare a lipidelor standard și prezintă un nivel de TG mai mare sau egal cu aproximativ 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 750 mg/dL, 1000 mg/dL sau mai mare, acest lucru indică faptul că pacientul este "nu răspunde la, controlat inadecvat de, sau intolerant la terapia standard de modificare a lipidelor" și poate beneficia de tratament folosind terapiile descrise aici.

În alte contexte, indiferent dacă este îndeplinită sau nu o reducere procentuală particulară a nivelului TG, TC, LDL-C sau non-HDL-C, în raport cu nivelul pacientului TG, TC, LDL-C sau non-HDL-C la un nivel un punct de pornire particular („linia de bază”) poate fi utilizat pentru a determina dacă pacientul a răspuns la terapia standard de modificare a lipidelor sau dacă acel pacient are nevoie de un tratament suplimentar folosind metodele și agenții prezentei invenții. De exemplu, o reducere a TG, TC, LDL-C sau non-HDL-C de mai puțin de 50% (de exemplu, mai puțin de 40%, mai puțin de 35%, mai puțin de 30%, mai puțin de 25% etc.) de la momentul inițial poate semnifica necesitatea terapiei folosind metodele și agenții invenției.

Prezenta invenție, în consecință, include metode de tratament care cuprind administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor ANGPTL8 combinat cu una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3 la un pacient, prin care nivelurile post-tratament ale pacientului de colesterol total, TG, LDL- C și/sau non-HDL-C sunt semnificativ reduse în număr. De exemplu, prezenta

invenție include metode terapeutice care cuprind administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor ANGPTL8 și una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3 unui pacient care urmează o terapie standard de modificare a lipidelor, dar care nu răspunde la o astfel de terapie sau este intolerant la o astfel de terapie, în care, după ce a primit una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL8 și una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL3, pacientul este capabil să atingă niveluri normale de colesterol total, TG, LDL-C sau non-LDL-C. În anumite cazuri, pacientul poate fi scos din terapia standard de modificare a lipidelor sau terapia standard de modificare a lipidelor poate fi continuată, dar poate fi administrată la doze mai mici și poate fi utilizată în combinație cu inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3, atinge și / sau menține un anumit nivel țintă de lipoproteine. Alternativ, pacientului i se poate administra terapia standard de modificare a lipidelor la doza normală prescrisă, dar frecvența administrării terapiei de modificare a lipidelor poate fi redusă dacă terapia standard de modificare a lipidelor trebuie administrată împreună cu combinația inhibitorului ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3. În unele cazuri, necesitatea tratamentului cu terapia standard de modificare a lipidelor de către pacient pentru a atinge și / sau menține un anumit nivel de lipoproteine țintă poate fi eliminată cu totul după administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor ANGPTL8 împreună cu inhibitorul ANGPTL3.

Conform anumitor exemple de realizare, prezenta invenție cuprinde metode pentru reducerea sau eliminarea necesității terapiei standard de modificare a lipidelor, în care metodele cuprind selectarea unui pacient cu hiperlipidemie (de exemplu, hipercolesterolemie sau hipertrigliceridemie) care a fost tratat cu terapie modificatoare de lipide în ultima lună, în ultimele 2 luni, în ultimele 3 luni, în ultimele 4 luni, în ultimele 5 luni, în ultimele 6 luni sau pentru o perioadă mai lungă și administrând una sau mai multe doze de inhibitor ANGPTL8 în asociere cu un inhibitor ANGPTL3 la pacient. Metodele conform acestui aspect al invenției au ca rezultat scăderea nivelului a cel puțin unei lipoproteine din serul pacientului și, în consecință, permit reducerea sau eliminarea necesității tratamentului cu terapia standard de modificare a lipidelor de către pacient. De exemplu, în anumite variante ale prezentei invenții, după administrarea uneia sau mai multor doze de inhibitor ANGPTL8 în combinație cu un inhibitor ANGPTL3, nivelul seric LDL-C al pacientului este redus la mai puțin decât un nivel definit (de exemplu, mai puțin mai mult de 100 mg / dL sau mai puțin de 70 mg / dL), sau colesterolul total este redus la un nivel definit (de exemplu, mai puțin de 200 mg / dL sau mai puțin de 150 mg / dL), sau nivelul TG este redus la un nivel definit (de exemplu, mai puțin de 200 mg / dL sau mai puțin de 150 mg / dL).

Conform anumitor exemple de realizare, pacientul care poate fi tratat prin metodele prezentei invenții are hipercolesterolemie (de exemplu, o concentrație serică de LDL-C mai mare sau egală cu 70 mg / dL sau o concentrație serică de LDL-C mai mare sau egală cu 100 mg / dL). Conform anumitor exemple de realizare, pacientul care este tratat prin metodele prezentei invenții are hipertrigliceridemie (de exemplu, o concentrație serică de TG mai mare sau egală cu 150 mg / dL sau o concentrație serică de TG mai mare sau egală cu 200 mg / dL). În anumite variante de realizare, hipercolesterolemia pacientului este controlată inadecvat prin terapia standard de modificare a lipidelor, de ex. terapia cu statine. De exemplu, prezenta invenție include metode pentru tratarea unui pacient care nu este receptiv, controlat necorespunzător de sau nu este tolerant la terapia cu o terapie standard de modificare a lipidelor, cum ar fi o statină, sau care are hipercolesterolemie care este controlată inadecvat de o zi doza de statină selectată din grupul format din atorvastatină (inclusiv atorvastatină + ezetimib), rosuvastatină, cerivastatină, pitavastatină, fluvastatină, lovastatină, simvastatină (inclusiv simvastatină + ezetimib), pravastatină și combinații ale acestora. Prezenta invenție include, de asemenea, metode pentru reducerea colesterolului, TG, LDL-C sau non-LDL-C la un pacient care are hipercolesterolemie sau hipertrigliceridemie și care prezintă intoleranță la statine sau care prezintă reacții adverse sau nedorite la terapia cu statine. (de exemplu, dureri musculare scheletice, dureri, slăbiciune sau crampe [de exemplu, mialgie, miopatie, rabdomioliză etc.]).

Selectarea pacientului

Prezenta invenție include metode și compoziții utile pentru tratarea pacienților care suferă de hiperlipidemie, care nu răspund la, sunt controlați în mod inadecvat sau sunt intoleranți la terapia cu o terapie standard de modificare a lipidelor. Pacienții care pot fi tratați prin metodele prezentei invenții pot prezenta, de asemenea, unul sau mai multe dintre criteriile de selecție suplimentare. De exemplu, un pacient poate fi selectat pentru tratamentul cu metodele prezentei invenții dacă pacientul este diagnosticat cu sau identificat ca fiind în pericol de a dezvolta o afecțiune de hipercolesterolemie, cum ar fi, de exemplu, hipercolesterolemia familială heterozigotă (heFH), hipercolesterolemia familială homozigotă (hoFH), Autosomal Dominant Hipercolesterolemia, hipercolesterolemia autozomală recesivă (ARH, de exemplu, ARH asociată cu mutații în LDLRAP1), precum și incidențele hipercolesterolemiei care sunt distincte de

Hipercolesterolemia familială (nonFH). Diagnosticul hipercolesterolemiei familiale (de exemplu, heFH sau hoFH) se poate face prin genotipare și / sau criterii clinice. Pentru pacienții care nu sunt genotipați, diagnosticul clinic se poate baza fie pe criteriile Simon Broome cu criterii pentru FH definite, fie pe criteriile OMS / Rețeaua lipidică olandeză cu un scor > 8 puncte.

5 Conform anumitor exemple de realizare, pacientul poate fi selectat pe baza unui istoric de boală coronariană (CHD). Așa cum este utilizat aici, o "istorie a CHD" (sau "istoria documentată a CHD") include unul sau mai multe dintre: (i) infarct miocardic acut (MI); (ii) MI tăcut; (iii) angina instabilă; (iv) procedura de revascularizare coronariană (de exemplu, intervenție coronariană percutanată [PCI] sau operație de grefă de by-pass de arteră coronariană [CABG]); și / sau (v) CHD semnificativ clinic diagnosticat prin teste invazive sau neinvazive (cum ar fi angiografia coronariană, testul de stres folosind banda de alergat, ecocardiografia de stres sau imagistica nucleară).

15 Conform anumitor exemple de realizare, pacientul poate fi selectat pe baza bolii cardiovasculare non-coronariene („BCV non-CHD”). Așa cum este utilizat aici, „BCV non-CHD” include unul sau mai multe dintre: (i) accident vascular cerebral ischemic anterior documentat cu un deficit neurologic ischemic focal care a persistat mai mult de 24 de ore, considerat ca fiind de origine aterotrombotică; (ii) boală arterială periferică; (iii) anevrismul aortic abdominal; (iv) stenoza aterosclerotică a arterei renale; și/sau (v) boala arterelor carotide (atacuri ischemice tranzitorii sau > 50% obstrucție a arterei carotide).

20 Conform anumitor exemple de realizare, pacientul poate fi selectat pe baza faptului că are unul sau mai mulți factori de risc suplimentari, cum ar fi, de exemplu, (i) boala renală cronică moderată documentată (CKD), definită de $30 \leq \text{eGFR} < 60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ timp de 3 luni sau mai mult; (ii) diabet zaharat de tip 1 sau tip 2 cu sau fără leziuni ale organelor țintă (de exemplu, retinopatie, nefropatie, microalbuminurie); (iii) un risc calculat de 10 ani de BCV letal $\text{SCORE} \geq 5\%$ (Orientări ESC/EAS pentru gestionarea dislipidemiilor, Conroy și colab., 2003, Eur. Heart J. 24: 987-1003).

25 Conform anumitor exemple de realizare, pacientul poate fi selectat pe baza faptului că are unul sau mai mulți factori de risc suplimentari selectați din grupul format din vârstă (de exemplu, mai mari de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 sau 80 de ani), rasă, origine națională, sex (bărbat sau femeie), obiceiuri de exercițiu (de exemplu, exercițiu fizic obișnuit, neexercitat), alte afecțiuni medicale preexistente (de exemplu, diabet de tip II, hipertensiune arterială etc.) și starea curentă a medicației (de exemplu, luând în prezent beta-blocante, niacină, ezetimib, fibratre, acizi grași omega-3, rășini ale acidului biliar etc.).

30 Conform anumitor variante ale prezentei invenției, subiectul care este tratat prin metodele invenției prezintă un nivel ridicat al unuia sau mai multor markeri inflamatori. Orice marker al inflamației sistemice poate fi utilizat în scopul prezentei invenției. Markerii inflamatori adecvați includ, fără limitare, proteina C reactivă, citokine (de exemplu, IL-6, IL-8 și/sau IL-17) și molecule de adeziune celulară (de exemplu, ICAM-1, ICAM-3, BL- CAM, LFA-2, VCAM-1, NCAM și PECAM).

40 Conform prezentei invenției, pacienții pot fi selectați pe baza unei combinații a unuia sau mai multor criterii de selecție sau caracteristici terapeutice de mai sus. De exemplu, conform anumitor exemple de realizare, un pacient adecvat pentru tratamentul cu metodele prezentei invenției poate fi selectat în plus pe baza de heFH sau non-FH în combinație cu: (i) un istoric de CHD documentat, (ii) BCV non-CHD și/sau (iii) diabet zaharat cu leziuni ale organelor țintă; astfel de pacienți pot fi, de asemenea, selectați pe baza unei concentrații serice de LDL-C mai mare sau egală cu 70 mg/dL.

45 Conform anumitor alte variante de realizare, un pacient adecvat pentru tratamentul cu metodele prezentei invenției, pe lângă faptul că are hipercolesterolemie care nu este controlată în mod adecvat de un regim zilnic de statine terapeutice cu doze moderate, poate fi selectat în continuare pe baza de heFH sau non-FH fără CHD sau BCV non-CHD, dar având fie (i) un risc calculat de 10 ani de BCV fatal $\text{SCORE} \geq 5\%$; sau (ii) diabet zaharat fără afectarea organelor țintă; astfel de pacienți pot fi, de asemenea, selectați pe baza unei concentrații serice de LDL-C mai mare sau egală cu 100 mg/dL.

50 Conform anumitor variante ale prezentei invenției, subiectul care poate fi tratat prin metodele invenției este un subiect care are sindromul chilomicronemiei familiale (FCS; cunoscut și ca deficit de lipoproteine lipază).

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

Administrarea unui inhibitor ANGPTL8 plus un inhibitor ANGPTL3 ca terapie suplimentară

Prezenta invenție include metode de tratament în care un pacient care este supus sau a fost supus recent terapiei standard de modificare a lipidelor (de exemplu, o statină) i se administrează un inhibitor ANGPTL8 plus un inhibitor ANGPTL3 în funcție de o cantitate și frecvență de dozare particulară și în care ANGPTL8 inhibitorul și inhibitorul ANGPTL3 sunt administrate ca un supliment la terapia preexistentă de modificare a lipidelor pacientului (dacă este cazul), cum ar fi un supliment la regimul de statine terapeutice zilnic preexistent al pacientului.

De exemplu, metodele prezentei invenții includ regimuri terapeutice suplimentare în care inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3 sunt administrate ca terapie suplimentară la același regim zilnic stabil de statină terapeutică (adică aceeași cantitate de dozare a statinei) ca și pacientul a fost activat înainte de a primi inhibitorii ANGPTL8 și ANGPTL3. În alte realizări, inhibitorii ANGPTL8 și ANGPTL3 sunt administrați ca terapie suplimentară la un regim terapeutic de statine care cuprinde o statină într-o cantitate care este mai mult sau mai mică decât doza de statină pe care pacientul o avea înainte de a primi inhibitorii ANGPTL8 și ANGPTL3. De exemplu, după începerea unui regim terapeutic care cuprinde un inhibitor ANGPTL8 și un Inhibitorul ANGPTL3 administrat la anumite frecvențe și cantități de dozare, doza zilnică de statină administrată sau prescrisă pacientului poate (a) să rămână aceeași, (b) crește sau (c) să scadă (de exemplu, titrat în sus sau titrat în jos) în comparație cu doza zilnică de statină pe care pacientul o lua înainte de a începe schema terapeutică a inhibitorilor ANGPTL8 și ANGPTL3, în funcție de necesitățile terapeutice ale pacientului.

Eficacitate terapeutică

Metodele prezentei invenții pot duce la reducerea nivelurilor serice ale unuia sau mai multor componente lipidice selectate din grupul constând din colesterol total, LDL-C, non-HDL-C, ApoB100, VLDL-C, trigliceride (TG), Lp (a) și colesterolul rămas. De exemplu, conform anumitor variante ale prezentei invenții, administrarea unui inhibitor ANGPTL8 în combinație cu un inhibitor ANGPTL3 la un subiect adecvat va avea ca rezultat o reducere procentuală medie față de valoarea inițială a colesterolului lipoproteic cu densitate scăzută serică (LDL-C) de cel puțin aproximativ 25%, 30%, 40%, 50%, 60% sau mai mult; o reducere procentuală medie față de valoarea inițială în ApoB100 de cel puțin aproximativ 25%, 30%, 40%, 50%, 60% sau mai mare; o reducere procentuală medie față de valoarea inițială în non-HDL-C de cel puțin aproximativ 25%, 30%, 40%, 50%, 60% sau mai mare; o reducere procentuală medie față de valoarea inițială a colesterolului total de cel puțin aproximativ 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% sau mai mare; o reducere procentuală medie față de valoarea inițială în VLDL-C de cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% sau mai mare; o reducere procentuală medie față de valoarea inițială a trigliceridelor de cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% sau mai mare; și / sau o reducere procentuală medie față de valoarea inițială în Lp (a) de cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25% sau mai mare.

Inhibitori ANGPTL8 și inhibitori ANGPTL3

Metodele prezentei invenții cuprind administrarea la un pacient a unei compoziții terapeutice cuprinzând un inhibitor ANGPTL8 și un inhibitor ANGPTL3.

Inhibitori ANGPTL8

Așa cum este utilizat aici, un "inhibitor ANGPTL8" este orice agent care se leagă sau interacționează cu ANGPTL8 uman și inhibă funcția biologică normală a ANGPTL8 in vitro sau in vivo. Exemple nelimitative de categorii de inhibitori ANGPTL8 includ antagoniști de molecule mici ANGPTL8, inhibitori pe bază de acid nucleic ai expresiei sau activității ANGPTL8 (de exemplu, ARNsi sau antisens), molecule pe bază de peptide care interacționează în mod specific cu ANGPTL8 (de exemplu, peptidocorpi), molecule receptor care interacționează în mod specific cu ANGPTL8, proteine care cuprind o porțiune de legare a ligandului unui receptor LDL, molecule de schelă de legare ANGPTL8 (de exemplu, DARPin, proteine repetate HEAT, proteine repetate ARM, proteine repetate tetratricopeptidice, construite de schelă pe bază de fibronectină, și alte schele bazate pe proteine repetate naturale etc., [vezi, de exemplu, Boersma și Pluckthun, 2011, Curr. Opin. Biotehnologie. 22: 849-857 și referințele citate aici]) și aptameri anti-ANGPTL8 sau porțiuni ale acestora. Conform anumitor variante de realizare, inhibitorii ANGPTL8 care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții sunt anticorpi anti-ANGPTL8 sau fragmente de anticorpi care leagă antigenul care leagă în mod specific ANGPTL8 uman.

Termenul "proteină umană asemănătoare angiopoietinei 8" sau "ANGPTL8 umană" sau "hANGPTL8", sau "ANGPTL8", este, de asemenea, denumit "lipasin", "RIFL" sau "betatrofină". ANGPTL8 uman se referă, de asemenea, la ANGPTL8 având secvența de proteine prezentată în aminoacizii 1-65 din SECV ID NR: 9, sau un fragment activ biologic al acestuia, precum și cel

prezentat în numărul de acces GenBank NP_061 157.3 (SECV ID NR: 19)) . Activitatea ANGPTL8 care poate fi neutralizată, inhibată, blocată, abrogată, redusă sau interferată cu un anticorp sau un fragment de legare a antigenului conform invenției include, dar nu se limitează la, inhibarea activității LPL sau scăderea trigliceridelor niveluri in vivo și altele asemenea.

5 **Inhibitori ANGPTL3**

Așa cum este utilizat aici, un "inhibitor ANGPTL3" este orice agent care se leagă sau interacționează cu ANGPTL3 uman și inhibă funcția biologică normală a ANGPTL3 in vitro sau in vivo. Exemple nelimitative de categorii de inhibitori ANGPTL3 includ antagoniști ANGPTL3 cu molecule mici, inhibitori pe bază de acid nucleic ai expresiei sau activității ANGPTL3 (de
10 exemplu, ARNs sau antisens), molecule pe bază de peptide care interacționează în mod specific cu ANGPTL3 (de exemplu, peptici), molecule receptor care interacționează în mod specific cu ANGPTL3, molecule de schelă de legare ANGPTL3 (de exemplu, DARPin, proteine repetate HEAT, proteine repetate ARM, proteine repetate tetratricopeptidice, construcții de schele pe bază de fibronectină și alte schele bazate pe proteine repetate naturale etc., [vezi, de exemplu, Boersma
15 și Pluckthun, 201 1, Curr. Opin. Biotehnologie. 22: 849-857 și referințele citate aici]) și aptameri anti-ANGPTL3 sau porțiuni ale acestora. Conform anumitor exemple de realizare, inhibitorii ANGPTL3 care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții sunt anticorpi anti-ANGPTL3 sau fragmente de anticorpi care leagă antigenul care leagă în mod specific ANGPTL3 uman.

Termenul "proteină-3 asemănătoare angiopoietinei umane" sau "ANGPTL3 umană" sau
20 "hANGPTL3", așa cum este utilizat aici, se referă la ANGPTL3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 18 (a se vedea, de asemenea, acces NCBI NP_055310), sau fragment activ al acestuia.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, este destinat să se refere la moleculele de imunoglobulină cuprinzând patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (H) și două lanțuri ușoare
25 (L) interconectate prin legături disulfidice, precum și multimeri ai acestora (de exemplu, IgM). Fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu (abreviat aici ca HCVR sau V_H) și o regiune constantă a lanțului greu. Regiunea constantă a lanțului greu cuprinde trei domenii, C_H1 , C_H2 și C_H3 . Fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (abreviat aici ca LCVR sau V_L) și o regiune constantă a lanțului ușor. Regiunea constantă a lanțului ușor cuprinde un domeniu (C_L1). Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, denumite regiuni care determină complementaritatea (CDR), intercalate cu regiuni mai conservate, denumite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L este compus din trei CDR-uri și patru FR-uri, dispuse de la amino-terminal la carboxy-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2,
30 FR3, CDR3, FR4. În diferite variante ale invenției, FR-urile anticorpului anti-ANGPTL8 (sau porțiunea de legare a antigenului acestuia) pot fi identice cu secvențele liniei germinale umane sau pot fi modificate în mod natural sau artificial. O secvență de consens de aminoacizi poate fi definită pe baza unei analize side-by-side a două sau mai multe CDR.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, include, de asemenea, fragmente care leagă antigenul de molecule complete de anticorpi. Termenii „porțiune de legare a antigenului” unui anticorp, „fragment de legare a antigenului” unui anticorp și alții asemănători, așa cum se
40 utilizează aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină sintetică sau modificată genetic care se leagă în mod specific antigen pentru a forma un complex. Fragmentele de legare la antigen ale unui anticorp pot fi derivate, de exemplu, din molecule complete de anticorpi utilizând orice tehnici standard adecvate, cum ar fi digestia proteolitică sau tehnici de inginerie genetică
45 recombinante care implică manipularea și exprimarea ADN-ului care codifică domeniile variabile ale anticorpului și opțional constante. Un astfel de ADN este cunoscut și / sau este ușor disponibil din, de exemplu, surse comerciale, biblioteci de ADN (incluzând, de exemplu, biblioteci de fagi-anticorpi), sau poate fi sintetizat. ADN-ul poate fi secvențiat și manipulat chimic sau utilizând tehnici de biologie moleculară, de exemplu, pentru a aranja unul sau mai multe domenii variabile
50 și / sau constante într-o configurație adecvată, sau pentru a introduce codoni, pentru a crea reziduuri de cisteină, pentru a modifica, adăuga sau șterge aminoacizi , etc.

Exemple nelimitative de fragmente care leagă antigenul includ: (i) fragmente Fab; (ii) F (ab')₂ fragmente; (iii) fragmente Fd; (iv) fragmente Fv; (v) molecule Fv (scFv) cu un singur lanț; (vi) fragmente dAb; și (vii) unități minime de recunoaștere constând din resturi de aminoacizi care
55 imită regiunea hipervariabilă a unui anticorp (de exemplu, un izolat regiune de determinare a complementarității (CDR), cum ar fi o peptidă CDR3), sau o peptidă constrânsă FR3-CDR3-FR4. Alte molecule proiectate, cum ar fi anticorpi specifici domeniului, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi șterse de domeniu, anticorpi himerici, anticorpi grefați cu CDR, diabete, triabocuri, tetocorpi, minicorpi, nanocorpi (de exemplu, nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți etc.),
60 mici imunofarmaceutice modulare (SMIP) și domeniile variabile ale rechinului IgNAR sunt, de asemenea, cuprinse în expresia „fragment de legare la antigen”, așa cum este utilizată aici.

Un fragment care leagă antigenul unui anticorp va cuprinde în mod tipic cel puțin un domeniu variabil. Domeniul variabil poate fi de orice dimensiune sau compoziție de aminoacizi și va cuprinde în general cel puțin un CDR, care este adiacent sau în cadru cu una sau mai multe secvențe cadru. În fragmentele care leagă antigenul având un domeniu V_H asociat cu un domeniu VL, domeniile V_H și VL pot fi situate unul față de celălalt în orice aranjament adecvat. De exemplu, regiunea variabilă poate fi dimerică și poate conține dimere V_H-V_H , V_H-V_L sau V_L-V_L . Alternativ, fragmentul care leagă antigenul unui anticorp poate conține un domeniu V_H sau V_L monomeric.

Un fragment de legare la antigen a unui anticorp poate conține cel puțin un domeniu variabil legat covalent de cel puțin un domeniu constant. Configurațiile exemplificate nelimitative ale domeniilor variabile și constante care pot fi găsite într-un fragment care leagă antigenul unui anticorp conform prezentei invenții includ: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$; și (xiv) V_L-C_L . În orice configurație de domenii variabile și constante, inclusiv oricare dintre exemplele din configurațiile enumerate mai sus, domeniile variabile și constante pot fi fie direct legate între ele, fie pot fi legate de o balama completă sau parțială sau o regiune de legătură. O regiune balama poate consta din cel puțin 2 (de exemplu, 5, 10, 15, 20, 40, 60 sau mai mulți) aminoacizi, care au ca rezultat o legătură flexibilă sau semiflexibilă între variabile adiacente și/sau domenii constante într-un singur moleculă polipeptidică. Mai mult, un fragment care leagă antigenul unui anticorp conform prezentei invenții poate cuprinde un homo-dimer sau hetero-dimer (sau alt multimer) din oricare dintre configurațiile domeniului variabil și constant enumerate mai sus în asociere non-covalentă între ele și / sau cu unul sau mai multe domenii V_H or monomeric V_L (de ex., prin legături de disulfură).

Ca și în cazul moleculelor de anticorp complet, fragmentele care leagă antigenul pot fi monospecifice sau multispecifice (de exemplu, bispecifice). Un fragment multispecific care leagă antigenul unui anticorp va cuprinde de obicei cel puțin două domenii variabile diferite, în care fiecare domeniu variabil este capabil să se lege în mod specific la un antigen separat sau la un epitop diferit pe același antigen. Orice format de anticorp multispecific, incluzând exemplele de formate de anticorpi bispecfici dezvăluite aici, poate fi adaptat pentru utilizare în contextul unui fragment de legare la antigen a unui anticorp conform prezentei invenții folosind tehnici de rutină disponibile în domeniu.

Regiunea constantă a unui anticorp este importantă în capacitatea unui anticorp de a fixa complementul și de a media citotoxicitatea dependentă de celule. Astfel, izotipul unui anticorp poate fi selectat pe baza dacă este de dorit ca anticorpul să medieze citotoxicitatea.

Termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă anticorpi având regiuni variabile și constante derivate din secvențe de imunoglobulină ale liniei germinale umane. Anticorpii umani ai invenției pot include totuși reziduuri de aminoacizi necodificate de secvențe de imunoglobulină ale liniei germinale umane (de exemplu, mutații introduse prin mutagenезă aleatorie sau specifică site-ului in vitro sau prin mutație somatică in vivo), de exemplu în CDR-uri și în special CDR3. Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă anticorpi în care secvențe CDR derivate din linia germinativă a altei specii de mamifere, cum ar fi un șoarece, au fost altoite pe secvențe cadru umane. Termenul include anticorpi produși recombinant la un mamifer neuman sau în celule ale unui mamifer neuman. Termenul nu este destinat să includă anticorpi izolați sau generați la un subiect uman.

Termenul "anticorp uman recombinant", așa cum este utilizat aici, este destinat să includă toți anticorpii umani care sunt preparați, exprimați, creați sau izolați prin mijloace recombinante, cum ar fi anticorpii exprimați folosind un vector de expresie recombinant transfectat într-o celulă gazdă (descriș mai jos mai jos), anticorpi izolați dintr-o bibliotecă recombinantă, combinatorie de anticorpi umani (descriși mai jos), anticorpi izolați de la un animal (de exemplu, un șoarece) care este transgenic pentru genele imunoglobulinei umane (a se vedea, de exemplu, Taylor și colab. (1992) Nucl. Acizi rez. 20: 6287-6295) sau anticorpi preparați, exprimați, creați sau izolați prin orice alt mijloc care implică îmbinarea secvențelor genei imunoglobulinei umane cu alte secvențe ADN. Astfel de anticorpi umani recombinanți au regiuni variabile și constante derivate din secvențe de imunoglobulină ale liniei germinale umane. Cu toate acestea, în anumite variante de realizare, astfel de anticorpi umani recombinanți sunt supuși mutagenезă in vitro (sau, atunci când este utilizat un transgenic animal pentru secvențe de Ig umane, mutagenезă somatică in vivo) și astfel secvențele de aminoacizi ale regiunilor V_H și V_L ale anticorpilor recombinanți sunt secvențe care, deși derivate și legate de secvențele V_H și V_L ale liniei germinale umane, pot să nu existe în mod natural în repertoriul liniei germinale ale anticorpilor in vivo.

Anticorpii umani pot exista sub două forme care sunt asociate cu heterogenitatea balamalei. Intr-o formă, o moleculă de imunoglobulină cuprinde un construct stabil cu patru lanțuri de aproximativ 150-160 kDa în care dimerii sunt ținuti împreună printr-o legătură disulfurică a lanțului greu între lanțuri. Într-o a doua formă, dimerii nu sunt legați prin legături disulfurice între lanțuri și o moleculă de aproximativ 75-80 kDa este formată dintr-un lanț ușor și greu cuplat covalent (semicorp). Aceste forme au fost extrem de dificil de separat, chiar și după purificarea afinității.

Frecvența apariției celei de-a doua forme în diferiți izotipuri IgG intacte se datorează, dar nu se limitează la, diferențelor structurale asociate cu izotipul regiunii balamale a anticorpului. O singură substituție de aminoacizi în regiunea balamalei balamalei IgG4 umană poate reduce semnificativ aspectul celei de-a doua forme (Angal și colab. (1993) Molecular Immunologie 30: 105) la niveluri observate în mod obișnuit folosind o balama IgG1 umană. Invenția de față cuprinde anticorpi care au una sau mai multe mutații în articulație, regiunea C_H2 sau C_H3 care pot fi de dorit, de exemplu, în producție, pentru a îmbunătăți randamentul formei de anticorp dorite.

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

Termenul "se leagă în mod specific" sau altele asemenea, înseamnă că un anticorp sau un fragment care leagă antigenul acestuia formează un complex cu un antigen care este relativ stabil în condiții fiziologice. Metodele pentru a determina dacă un anticorp se leagă în mod specific de un antigen sunt bine cunoscute în domeniu și includ, de exemplu, dializa de echilibru, rezonanța plasmonică de suprafață și altele asemenea. De exemplu, un anticorp care „leagă în mod specific” ANGPTL8 sau care „leagă în mod specific” ANGPTL3, așa cum este utilizat în contextul prezentei invenții, include anticorpi care leagă ANGPTL8 sau ANGPTL3 sau o porțiune a acestuia cu un KD₀₁ mai mic de aproximativ 1000 nM, sub 500 nM, sub 300 nM, sub 200 nM, sub 100 nM, sub 90 nM, sub 80 nM, sub 70 nM, sub 60 nM, mai puțin de aproximativ 50 nM, mai puțin de aproximativ 40 nM, mai puțin de aproximativ 30 nM, mai puțin de aproximativ 20 nM, mai puțin de aproximativ 10 nM, mai puțin de aproximativ 5 nM, mai puțin de aproximativ 4 nM, mai puțin de aproximativ 3 nM, mai puțin de aproximativ 2 nM, mai puțin de aproximativ 1 nM sau mai puțin de aproximativ 0,5 nM, măsurat într-un test de rezonanță plasmonică de suprafață. Un anticorp izolat care leagă în mod specific ANGPTL8 uman sau ANGPTL3 uman, cu toate acestea, are reactivitate încrucișată la alți antigeni, cum ar fi molecule ANGPTL8 sau molecule ANGPTL3 de la alte specii (neumane).

Anticorpii anti-ANGPTL8 și anti-ANGPTL3 utili pentru metodele prezentei invenții pot cuprinde una sau mai multe substituții de aminoacizi, inserții și / sau deleții în cadrul și / sau regiunile CDR ale domeniilor variabile ale lanțului greu și ușor, în comparație la secvențele corespunzătoare liniei germinale din care au fost derivați anticorpii. Astfel de mutații pot fi ușor constatate comparând secvențele de aminoacizi dezvăluite aici cu secvențele de linie germinativă disponibile, de exemplu, din bazele de date publice de secvențe de anticorpi. Prezenta invenție include metode care implică utilizarea anticorpilor și fragmente de legare a antigenului acestora, care sunt derivate din oricare dintre secvențele de aminoacizi dezvăluite aici, în care unul sau mai mulți aminoacizi într-unul sau mai multe cadre și / sau regiuni CDR sunt mutați la reziduul (reziduurile) corespunzător al secvenței liniei germinale din care a fost derivat anticorpul, sau la reziduul (reziduurile) corespunzător al unei alte secvențe ale liniei germinale umane sau la o substituție conservatoare de aminoacizi a reziduului (reziduurilor) liniei germinale corespunzătoare (astfel de secvențe se modifică sunt denumiți aici în mod colectiv „mutații ale liniei germinale”). O persoană cu calificare obișnuită în domeniu, începând cu secvențele cu regiune variabilă cu lanț greu și ușor dezvăluite aici, poate produce cu ușurință numeroși anticorpi și fragmente care leagă antigenul care cuprind una sau mai multe mutații individuale ale liniei germinale sau combinații ale acestora. În anumite realizări, toate resturile cadru și / sau CDR din domeniile V_H și / sau V_L sunt mutate înapoi la resturile găsite în secvența originală a liniei germinale din care a fost derivat anticorpul. În alte variante de realizare, numai anumite reziduuri sunt mutate înapoi la secvența inițială a liniei germinale, de exemplu, numai reziduurile mutate găsite în primii 8 aminoacizi ai FR1 sau în ultimii 8 aminoacizi ai FR4 sau doar resturile mutate găsite în CDR1, CDR2 sau CDR3. În alte variante de realizare, unul sau mai multe resturi de cadru și / sau CDR sunt mutate la reziduurile corespunzătoare ale unei secvențe de linie germinativă diferită (adică, o secvență de linie germinativă care este diferită de secvența liniei germinale din care a fost anticorpul derivat

inițial). Mai mult, anticorpii conform prezentei invenții pot conține orice combinație de două sau mai multe mutații ale liniei germinale în cadrul și / sau regiunile CDR, de exemplu, în care anumite reziduuri individuale sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe specifice ale liniei germinale, în timp ce anumite alte reziduuri care diferă din secvența originală a liniei germinale sunt menținute sau sunt mutate la reziduul corespunzător al unei secvențe diferite ale liniei germinale. Odată obținuți, anticorpii și fragmentele care leagă antigenul care conțin una sau mai multe mutații ale liniei germinale pot fi ușor testate pentru una sau mai multe proprietăți dorite, cum ar fi, specificitate de legare îmbunătățită, afinitate de legare crescută, proprietăți biologice antagoniste sau agoniste îmbunătățite sau îmbunătățite (după caz fie), imunogenitate redusă etc.

Prezenta invenție include, de asemenea, metode care implică utilizarea anticorpilor anti-ANGPTL8 și anti-ANGPTL3 care cuprind variante ale oricăreia dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și / sau CDR dezvoltate aici având una sau mai multe substituții conservatoare. De exemplu, prezenta invenție include utilizarea anticorpilor anti-ANGPTL8 și anti-ANGPTL3 având secvențe de aminoacizi HCVR, LCVR și/sau CDR cu, de exemplu, 10 sau mai puțin, 8 sau mai puțin, 6 sau mai puțin, 4 sau mai puțin, etc. substituții conservatoare de aminoacizi în raport cu oricare dintre secvențele de aminoacizi HCVR, LCVR și / sau CDR dezvoltate aici.

Termenul "rezonanță plasmonică de suprafață", așa cum este utilizat aici, se referă la un dispozitiv optic fenomen care permite analiza interacțiunilor în timp real prin detectarea modificărilor concentrațiilor de proteine într-o matrice de biosenzori, de exemplu folosind sistemul BIAcore™ (divizia Biacore Life Sciences a GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Termenul "KD", așa cum este utilizat aici, este destinat să se refere la constanta de disociere a echilibrului unei interacțiuni particulare anticorp-antigen.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului în regiunea variabilă a unei molecule de anticorp cunoscută sub numele de paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, diferiți anticorpi se pot lega de diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Epitopii pot fi conformaționali sau liniari. Un epitop conformațional este produs de aminoacizi juxtapuși spațial din diferite segmente ale lanțului polipeptidic liniar. Un epitop liniar este unul produs de resturile de aminoacizi adiacente într-un lanț polipeptidic. În anumite circumstanțe, un epitop poate include porțiuni de zaharide, grupări fosforil sau grupări sulfonil pe antigen.

Conform anumitor exemple de realizare, anticorpii anti-ANGPTL8 și anti-ANGPTL3 utilizați în metodele prezentei invenții sunt anticorpi cu caracteristici de legare dependente de pH. Așa cum este utilizat aici, expresia „legare dependentă de pH” înseamnă că anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia prezintă „legare redusă la ANGPTL8 la pH acid în comparație cu pH neutru” (în scopul prezentei dezvoltări, ambele expresii pot fi utilizate interschimbabil), sau că anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului acestuia prezintă „legare redusă la ANGPTL3 la pH acid în comparație cu pH neutru” (în scopul prezentei dezvoltări, ambele expresii pot fi utilizate interschimbabil). Pentru exemplu, anticorpii "cu caracteristici de legare dependente de pH" includ anticorpi și fragmente de legare a antigenului acestora care se leagă fie la ANGPTL8, fie la ANGPTL3 cu afinitate mai mare la pH neutru decât la pH acid. În anumite variante de realizare, anticorpii și fragmentele care leagă antigenul conform prezentei invenții leagă ANGPTL8 sau ANGPTL3 cu cel puțin 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 sau afinitate de mai multe ori mai mare la pH neutru decât la pH acid.

Anticorpii anti-ANGPTL8 sau Anticorpii ANGPTL3 cu caracteristici de legare dependente de pH pot avea una sau mai multe variații de aminoacizi în raport cu anticorpul anti-ANGPTL8 parental sau anticorpul anti-ANGPTL3 parental. De exemplu, un anticorp anti-ANGPTL8 sau un anticorp anti-ANGPTL3 cu caracteristici de legare dependente de pH poate conține una sau mai multe substituții sau inserții de histidină, de exemplu, într-unul sau mai multe CDR-uri ale unui anti-ANGPTL8 parental, sau un anti-parental Anticorp ANGPTL3. Astfel, conform anumitor variante ale prezentei invenții, sunt furnizate metode care cuprind administrarea unui anticorp anti-ANGPTL8 și a unui anticorp anti-ANGPTL3 care cuprinde secvențe de aminoacizi CDR (de exemplu, CDR-uri cu lanț greu și ușor) care sunt identice cu aminoacidul CDR secvențe ale unui anticorp parental anti-ANGPTL8 sau anticorp parental ANGPTL3 cu excepția substituirii unuia sau mai multor aminoacizi a unuia sau mai multor CDR-uri ale anticorpului parental cu un reziduu de histidină. Anticorpii anti-ANGPTL8 sau anticorpii anti-ANGPTL3 cu legare dependentă de pH pot avea, de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau mai multe substituții de histidină, fie într-un singur CDR de un anticorp parental sau distribuit în mai multe CDR-uri multiple (de exemplu, 2, 3, 4, 5 sau 6) ale unui anticorp parental anti-ANGPTL8 sau un anticorp parental anti-ANGPTL3. De exemplu, prezenta invenție include utilizarea de anticorpi anti-ANGPTL8 și anticorpi anti-

ANGPTL3 cu legare dependentă de pH cuprinzând una sau mai multe substituții de histidină în HCDR1, una sau mai multe substituții de histidină în HCDR2, una sau mai multe substituții de histidină în HCDR3, una sau mai multe substituții de histidină în LCDR1, una sau mai multe substituții de histidină în LCDR2 și / sau una sau mai multe substituții de histidină în LCDR3, ale unui anticorp parental anti-ANGPTL8 sau un anticorp parental anti-ANGPTL3.

Așa cum este utilizat aici, expresia "pH acid" înseamnă un pH de 6,0 sau mai puțin (de exemplu, mai puțin de aproximativ 6,0, mai puțin de aproximativ 5,5, mai puțin de aproximativ 5,0 etc.). Expresia „pH acid” include valori ale pH-ului de aproximativ 6,0, 5,95, 5,90, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 sau mai puțin. Așa cum este utilizat aici, expresia "pH neutru" înseamnă un pH de aproximativ 7,0 până la aproximativ 7,4. Expresia „pH neutru” include valori ale pH-ului de aproximativ 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 și 7,4.

Un anticorp anti-ANGPTL8 care poate fi utilizat în contextul prezentei invenții include un anticorp anti-ANGPTL8 care cuprinde cele trei regiuni de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR) conținute în regiunea variabilă a lanțului greu (HCVR) a SECV ID NR: 1 și cele trei regiuni de determinare a complementarității lanțului ușor (LCDR) conținute în regiunea variabilă a lanțului ușor (LCVR) din SECV ID NR: 5. În prezenta invenție, un anticorp anti-ANGPTL8 care poate fi utilizat în contextul prezentei invenții include un anticorp anti-ANGPTL8 care cuprinde HCDR1 din SECV ID NR: 2, HCDR2 din SECV ID NR: 3, HCDR3 din SECV ID NU: 4, LCDR1 din SECV ID NR: 6, LCDR2 din SECV ID NR: 7 și LCDR3 din SECV ID NR: 8. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-ANGPTL8 care poate fi utilizat în contextul prezentei invenții include un anticorp anti-ANGPTL8 care cuprinde perechea de secvențe de aminoacizi HCVR / LCVR din SEQ ID NO: 1/5.

Un anticorp anti-ANGPTL3 care poate fi utilizat în contextul prezentei invenții include evinacumab, care cuprinde cele trei lanțuri grele regiunile de determinare a complementarității (HCDR) conținute în regiunea variabilă a lanțului greu (HCVR) din SEQ ID NO: 10 și cele trei regiuni de determinare a complementarității lanțului ușor (LCDR) conținute în regiunea variabilă a lanțului ușor (LCVR) din SEQ ID NO: 14. Evinacumab cuprinde HCDR1 din SECV ID NR: 11, HCDR2 din SECV ID NR: 12, HCDR3 din SECV ID NR: 13, LCDR1 din SECV ID NR: 15, LCDR2 din SECV ID NR: 16 și LCDR3 din SECV ID NR: 17. Evinacumab cuprinde perechea de secvențe de aminoacizi HCVR / LCVR din SEQ ID NO: 10/14.

Pregătirea anticorpilor umani

Anticorpul anti-ANGPTL8 și anticorpul anti-ANGPTL3 pot fi fabricați conform oricărei metode de producere / izolare a anticorpilor cunoscută în domeniu. De exemplu, anticorpul pentru utilizare în metodele prezentei invenții pot fi produși prin tehnologii hibridoma, prin afișarea fagilor, prin afișarea drojdiei etc. Anticorpul pentru utilizare în metodele prezentei invenții pot fi, de exemplu, anticorpi himerici, anticorpi umanizați sau anticorpi complet umani.

Metode de generare a anticorpilor umani la șoareci transgenici sunt cunoscute în domeniu. Orice astfel de metode cunoscute pot fi utilizate în contextul prezentei invenții pentru a produce anticorpi umani care leagă în mod specific ANGPTL8 sau ANGPTL3.

De exemplu, folosind tehnologia VELOCIMMUNE™ (vezi, de exemplu, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals) sau orice altă metodă cunoscută pentru generarea anticorpilor monoclonali, anticorpul himeric cu afinitate ridicată la ANGPTL8 sau la ANGPTL3 sunt inițial izolați având o regiune variabilă umană și un șoarece regiune constantă. Tehnologia VELOCIMMUNE® implică generarea unui șoarece transgenic având un genom care cuprinde regiuni variabile ale lanțului greu și ușor uman legate în mod operațional de loci de regiune constantă endogenă a șoarecilor, astfel încât șoarecele să producă un anticorp care cuprinde o regiune variabilă umană și o regiune constantă a șoarecelui ca răspuns la antigenic. stimulare. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale anticorpului sunt izolate și legate în mod operațional de ADN-ul care codifică regiunile constante ale lanțului greu și ușor uman. ADN-ul este apoi exprimat într-o celulă capabilă să exprime anticorpul complet uman.

În general, un șoarece VELOCIMMUNE® este provocat de antigenul de interes, iar celulele limfatice (cum ar fi celulele B) sunt recuperate de la șoarecii care exprimă anticorpi. Celulele limfatice pot fi fuzionate cu o linie celulară de mielom pentru a pregăti linii celulare de hibridom nemuritor și astfel de linii celulare de hibridom sunt selectate și selectate pentru a identifica linii celulare de hibridom care produc anticorpi specifici antigenului de interes. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțului greu și lanțului ușor poate fi izolat și legat de regiunile constante izotipice dorite ale lanțului greu și lanțului ușor. O astfel de proteină de anticorp poate fi produsă într-o celulă, cum ar fi o celulă CHO. Alternativ, ADN-ul care codifică anticorpul himeric specifici antigenului sau domeniile variabile ale lanțurilor ușoare și grele poate fi izolat direct de antigenul specific limfocite.

Inițial, anticorpii himerici cu afinitate ridicată sunt izolați având o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Anticorpii sunt caracterizați și selectați pentru caracteristicile dorite, incluzând afinitatea, selectivitatea, epitopul etc., utilizând proceduri standard cunoscute specialiștilor în domeniu. Regiunile constante ale șoarecilor sunt înlocuite cu o regiune constantă umană dorită pentru a genera anticorpii complet umani conform invenției, de exemplu IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificat. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate ridicată și specificitatea țintei se află în regiunea variabilă.

În general, anticorpii care pot fi utilizați în metodele prezentei invenții posedă afinități mari, așa cum este descris mai sus, atunci când sunt măsurați prin legarea la antigen fie imobilizată pe fază solidă, fie în fază de soluție. Regiunile constante ale șoarecilor sunt înlocuite cu regiunile constante umane dorite pentru a genera anticorpii complet umani ai invenției. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate ridicată și specificitatea țintei se află în regiunea variabilă.

Exemple specifice de anticorpi umani sau fragmente de anticorpi care leagă antigenul care leagă în mod specific ANGPTL8, care pot fi folosiți în contextul metodelor prezentei invenții includ anticorpi sau proteine care leagă antigenul cuprinzând cele șase CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3) din perechea de secvențe de aminoacizi cu regiune variabilă a lanțului greu și ușor (HCVR/LCVR) cuprinzând SEQ ID NOS: 1/5.

În anumite variante ale prezentei invenții, anticorpii anti-ANGPTL8 sau fragmentul acestuia care leagă antigenul, care poate fi utilizat în metodele prezentei invenții cuprinde regiuni de determinare a complementarității lanțului greu și ușor (HCDR1-HCDR2- HCDR3/LCDR1 -LCDR2 -LCDR3) cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SECV ID NR: 2, 3, 4, 6, 7 și 8.

În anumite variante ale prezentei invenții, anticorpii anti-ANGPTL8 sau fragmentul de legare a antigenului acestuia, care poate fi utilizat în metodele prezentei invenții cuprinde un HCVR având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 1 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5.

Exemple specifice de anticorpi umani sau fragmente de anticorpi care leagă antigenul care leagă în mod specific ANGPTL3, care pot fi folosiți în contextul metodelor prezentei invenții includ anticorpi sau proteine care leagă antigenul cuprinzând cele șase CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 și LCDR3) din perechea de secvențe de aminoacizi cu regiune variabilă a lanțului greu și ușor (HCVR/LCVR) cuprinzând SEQ ID NOS: 10/14.

[0118] În prezenta invenție, anticorpii anti-ANGPTL3 sau fragmentul acestuia care leagă antigenul, care poate fi utilizat în metodele prezentei invenții cuprinde regiuni de determinare a complementarității lanțului greu și ușor (HCDR1-HCDR2- HCDR3/LCDR1 -LCDR2 -LCDR3) cuprinzând secvențele de aminoacizi ale SECV ID NR: 11, 12, 13, 15, 16 și 17.

În anumite variante ale prezentei invenții, anticorpii anti-ANGPTL3 sau fragmentul acestuia care leagă antigenul, care poate fi utilizat în metodele prezentei invenții cuprinde un HCVR având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 10 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 14.

Compoziții farmaceutice și metode de administrare

Prezenta invenție include metode, care cuprind administrarea unui inhibitor ANGPTL8 unui pacient în combinație cu un inhibitor ANGPTL3, în care inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3 sunt conținute în același sau în compoziții farmaceutice diferite. Compozițiile farmaceutice conform invenției sunt formulate cu purtători, excipienți și alți agenți adecvați care asigură transferul adecvat, eliberarea, toleranța și altele asemenea. O multitudine de formulări adecvate pot fi găsite în formularul cunoscut de toți chimiștii farmaceutici: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Aceste formulări includ, de exemplu, pulberi, paste, unguente, jeleuri, ceruri, uleiuri, lipide, lipide (cationice sau anionice) care conțin vezicule (cum ar fi LIPOFECTIN™), conjugate ADN, paste de absorbție anhidre, ulei în apă și apă -emulsii în ulei, emulsii carbowax (polietilen glicoli de diferite greutatea moleculare), geluri semi-solide și amestecuri semi-solide care conțin carbowax. Vezi și Powell și colab. "Compendiu de excipienți pentru formulări parenterale" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

Exemple de formulări farmaceutice care cuprind anticorpi anti-ANGPTL8 și/sau anticorpi ANGPTL3 care pot fi utilizați în contextul prezentei invenții includ oricare dintre formulările prevăzute în US 8.795.669 sau în WO2013/166448 sau WO2012/168491.

Sunt cunoscute diverse sisteme de livrare și pot fi utilizate pentru administrarea compoziției farmaceutice a invenției, de exemplu, încapsularea în lipozomi, microparticule, microcapsule, celule recombinante capabile să exprime virusurile mutante, endocitoza mediată de receptor (a se vedea, de exemplu, Wu și colab., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Metodele de administrare

includ, dar nu se limitează la, căi intradermice, intramusculare, intraperitoneale, intravenoase, subcutanate, intranasale, epidurale și orale. Compoziția poate fi administrată pe orice cale convenabilă, de exemplu prin perfuzie sau injecție în bolus, prin absorbție prin epitelial sau mucoase mucocutanate (de exemplu, mucoasa bucală, mucoasa rectală și intestinală etc.) și pot fi

5 administrate împreună cu alți agenți biologici activi.

O compoziție farmaceutică conform prezentei invenții poate fi administrată subcutanat sau intravenos cu un ac și seringă standard. În plus, în ceea ce privește eliberarea subcutanată, un dispozitiv de eliberare a stiloului are ușor aplicații în furnizarea unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Un astfel de dispozitiv de livrare stilou poate fi reutilizabil sau de unică

10 folosință. Un dispozitiv de livrare stilou reutilizabil utilizează în general un cartuș înlocuibil care conține o compoziție farmaceutică. Odată ce toată compoziția farmaceutică din cartuș a fost administrată și cartușul este gol, cartușul gol poate fi ușor aruncat și înlocuit cu un cartuș nou care conține o compoziție farmaceutică. Dispozitivul de livrare a stiloului poate fi apoi reutilizat. Într-un dispozitiv de livrare stilou de unică folosință, nu există cartuș înlocuibil. Mai degrabă, dispozitivul

15 de livrare a stiloului de unică folosință este preumplut cu compoziția farmaceutică ținută într-un rezervor din dispozitiv. Odată ce rezervorul este golit de compoziția farmaceutică, întregul dispozitiv este aruncat.

Numeroase dispozitive de livrare stilou și autoinjector reutilizabile au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții. Exemplele

20 includ, dar nu se limitează la AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Marea Britanie), Stilou DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Elveția), stilou HUMALOG MIX 75/25™, stilou HUMALOG™, stilou HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly și Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II și III (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhaga, Danemarca), stilou BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ și OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germania), pentru a numi doar câteva. Exemple de dispozitive de eliberare a stiloului de unică folosință care au aplicații în administrarea subcutanată a unei compoziții farmaceutice conform prezentei invenții includ, dar nu sunt limitate la stiloul SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) și KWIKPEN™ (Eli Lilly), autoinjectorul SURECLICK™

25 (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germania), EPIPEN (Dey, LP) și stiloul HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), pentru numiți doar câteva.

În anumite situații, compoziția farmaceutică poate fi livrată într-un sistem cu eliberare controlată. Într-o variantă de realizare, poate fi utilizată o pompă (vezi Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). Într-o altă realizare, pot fi utilizate materiale

35 polimerice; a se vedea, Aplicații medicale de eliberare controlată, Langer și Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. Într-un alt exemplu de realizare, un sistem de eliberare controlată poate fi plasat în apropierea țintei compoziției, necesitând astfel doar o fracțiune din doza sistemică (vezi, de exemplu, Goodson, 1984, în Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Alte sisteme cu eliberare controlată sunt discutate în revizuirea lui

40 Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Preparatele injectabile pot include forme de dozare pentru injecții intravenoase, subcutanate, intracutane și intramusculare, perfuzii de picurare etc. Aceste preparate injectabile pot fi preparate prin metode cunoscute. De exemplu, preparatele injectabile pot fi preparate, de exemplu, prin dizolvarea, suspendarea sau emulsionarea anticorpului sau a sării sale descrise mai

45 sus într-un mediu apos steril sau un mediu uleios utilizat convențional pentru injecții. Ca mediu apos pentru injecții, există, de exemplu, ser fiziologic, o soluție izotonică care conține glucoză și alți agenți auxiliari etc., care poate fi utilizată în combinație cu un agent solubilizant adecvat, cum ar fi un alcool (de exemplu, etanol), un polialcool (de exemplu, propilen glicol, polietilen glicol), un agent tensioactiv neionic [de exemplu, polisorbitat 80, HCO-50 (polioxietilenă (50 mol) aduct de ulei de ricin hidrogenat)] etc. Ca mediu uleios, sunt folosiți, de exemplu, ulei de susan, ulei de soia etc., care pot fi folosiți în combinație cu un agent de solubilizare, cum ar fi benzoatul de benzii, alcoolul benzilic etc. Injecția astfel preparată este de preferință umplută într-o fiolă adecvată.

În mod avantajos, compozițiile farmaceutice pentru uz oral sau parenteral descrise mai sus sunt preparate în forme de dozare într-o doză unitară adecvată pentru a se potrivi unei doze de

55 ingrediente active. Astfel de forme de dozare într-o doză unitară includ, de exemplu, tablete, pastile, capsule, injecții (fiole), supozitoare etc.

Dozare

Cantitatea unui inhibitor ANGPTL8 (de exemplu, anticorp anti-ANGPTL8) sau a unui inhibitor ANGPTL3 (de exemplu, anticorp anti-ANGPTL3) administrat unui subiect conform

60 metodelor prezentei invenții este, în general, o cantitate eficientă terapeutică. Așa cum este utilizat aici, sintagma „cantitate eficientă terapeutică dintr-un inhibitor ANGPTL8” înseamnă o doză de

inhibitor ANGPTL8, atunci când este administrată în combinație cu un inhibitor ANGPTL3, are ca rezultat o reducere detectabilă (cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau mai mult din linia de bază) în unul sau mai mulți parametri selectați din grup constând din colesterol total, LDL-C, ApoB100, non-HDL-C, VLDL-C, trigliceride, Lp (a) și colesterol restant, sau o cantitate care reduce sau elimină nevoia pacientului de alte intervenții terapeutice, cum ar fi, lipoproteina afereză sau care reduce rata normalizată de afereză a unui pacient.

În cazul unui anticorp anti-ANGPTL8, o cantitate eficientă terapeutic poate fi de la aproximativ 0,05 mg la aproximativ 600 mg, de exemplu, aproximativ 0,05 mg, aproximativ 0,1 mg, aproximativ 1, 0 mg, aproximativ 1, 5 mg, aproximativ 2,0 mg, aproximativ 10 mg, aproximativ 20 mg, aproximativ 30 mg, aproximativ 40 mg, aproximativ 50 mg, aproximativ 60 mg, aproximativ 70 mg, aproximativ 80 mg, aproximativ 90 mg, aproximativ 100 mg, aproximativ 110 mg, aproximativ 120 mg, aproximativ 130 mg, aproximativ 140 mg, aproximativ 160 mg, aproximativ 170 mg, aproximativ 180 mg, aproximativ 190 mg, aproximativ 200 mg, aproximativ 210 mg, aproximativ 220 mg, aproximativ 230 mg, aproximativ 240 mg, aproximativ 250 mg, aproximativ 260 mg, aproximativ 270 mg, aproximativ 280 mg, aproximativ 290 mg, aproximativ 300 mg, aproximativ 310 mg, aproximativ 320 mg, aproximativ 330 mg, aproximativ 340 mg, aproximativ 350 mg, aproximativ 360 mg, aproximativ 370 mg, aproximativ 380 mg, aproximativ 390 mg, aproximativ 400 mg, aproximativ 410 mg, aproximativ 420 mg, aproximativ 430 mg, aproximativ 440 mg, aproximativ 450 mg, aproximativ 460 mg, aproximativ 470 mg, aproximativ 480 mg, aproximativ 490 mg, aproximativ 500 mg, aproximativ 510 mg, aproximativ 520 mg, aproximativ 530 mg, aproximativ 540 mg, aproximativ 550 mg, aproximativ 560 mg, aproximativ 570 mg, aproximativ 580 mg, aproximativ 590 mg sau aproximativ 600 mg din anticorpul anti-ANGPTL8. Conform anumitor exemple de realizare a prezentei invenții, o cantitate eficientă terapeutic dintr-un anticorp anti-ANGPTL8 este de 75 mg, 150 mg sau 300 mg (de exemplu, în cazul alirocumab), sau 140 mg sau 420 mg (de exemplu, în caz de evolocumab). Alte cantități de dozare de inhibitori ANGPTL8 vor fi evidente persoanelor cu calificare obișnuită în domeniu și sunt avute în vedere în cadrul prezentei invenții.

Cantitatea de anticorp anti-ANGPTL8 conținută în dozele individuale poate fi exprimată în termeni de miligrame de anticorp pe kilogram de greutate corporală a pacientului (adică mg/kg). De exemplu, anticorpul anti-ANGPTL8 poate fi administrat unui pacient la o doză de aproximativ 0,0001 până la aproximativ 10 mg/kg din greutatea corporală a pacientului.

Cantitatea de inhibitor ANGPTL3 (de exemplu, anticorp anti-ANGPTL3) administrat unui subiect conform metodelor prezentei invenții este, în general, o cantitate eficientă terapeutic. Așa cum este utilizat aici, sintagma „cantitate eficientă terapeutic dintr-un inhibitor ANGPTL3” înseamnă o doză de inhibitor ANGPTL3, atunci când este combinată cu un inhibitor ANGPTL8, are ca rezultat o reducere detectabilă (cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% sau mai mult de la linia de bază) în unul sau mai mulți parametri selectați din grupul format din total colesterol, LDL-C, ApoB100, non-HDL-C, VLDL-C, trigliceride, Lp (a) și colesterol restant, sau o cantitate care previne sau atenuează ateroscleroza la un subiect (așa cum este descris în altă parte aici).

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

Cantitatea de anticorp anti-ANGPTL3 conținută în dozele individuale poate fi exprimată în termeni de miligrame de anticorp pe kilogram de greutate corporală a pacientului (adică mg/kg).

De exemplu, anticorpus anti-ANGPTL3 poate fi administrat unui pacient la o doză de aproximativ 0,0001 până la aproximativ 10 mg / kg din greutatea corporală a pacientului.

Terapii combinate

Așa cum este descris în altă parte aici, metodele prezentei invenții pot cuprinde administrarea unui inhibitor ANGPTL8 în combinație cu un inhibitor ANGPTL3 unui pacient care nu este receptiv la, controlat inadecvat de sau este intolerant la o terapie standard de scădere a lipidelor. În anumite variante de realizare, necesitatea unei administrări suplimentare a terapiei de scădere a lipidelor poate fi eliminată cu totul. În anumite variante de realizare, utilizarea combinată a inhibitorului ANGPTL8 cu inhibitorul ANGPTL3 poate fi utilizată în combinație cu („pe deasupra”) terapiei de scădere a lipidelor prescrisă anterior de pacient. De exemplu, în contextul scăderii a cel puțin unui parametru lipidic / lipoproteic la un pacient care suferă de hiperlipidemie (de exemplu, hipercolesterolemie sau hipertrigliceridemie), în care pacientul nu este receptiv la, controlat inadecvat de sau este intolerant la o terapie standard de scădere a lipidelor, o combinație dintr-un inhibitor ANGPTL8 cu un inhibitor ANGPTL3 poate fi administrată unui pacient în combinație cu un regim zilnic stabil de statină terapeutică. Exemple de regimuri de statine terapeutice zilnice cu care un inhibitor ANGPTL8 plus un inhibitor ANGPTL3 poate fi administrat în combinație cu în contextul prezentei invenții includ, de exemplu, atorvastatină (10, 20, 40 sau 80 mg pe zi), (atorvastatină / ezetimib 10/10 sau 40/10 mg pe zi), rosuvastatină (5, 10 sau 20 mg pe zi), cerivastatină (0,4 sau 0,8 mg pe zi), pitavastatină (1, 2 sau 4 mg pe zi), fluvastatină (20, 40 sau 80 mg pe zi), simvastatină (5, 10, 20, 40 sau 80 mg pe zi), simvastatină / ezetimib (10/10, 20/10, 40/10 sau 80/10 mg pe zi), lovastatină (10, 20, 40 sau 80 mg pe zi), pravastatină (10, 20, 40 sau 80 mg pe zi) și combinații ale acestora. Alte terapii modificatoare de lipide cu care un inhibitor ANGPTL8 plus un inhibitor ANGPTL3 pot fi administrate în combinație cu în contextul prezentei invenții includ, de exemplu, (1) un agent care inhibă absorbția colesterolului și sau reabsorbția acidului biliar (de exemplu, ezetimib); (2) un agent care crește catabolismul lipoproteinelor (cum ar fi niacina); și / sau (3) activatori ai factorului de transcripție LXR care joacă un rol în eliminarea colesterolului, cum ar fi 22-hidroxicolesterol.

Un exemplu nelimitativ de anticorp anti-ANGPTL8 care poate fi utilizat în contextul prezentei invenții include un anticorp cuprinzând perechea de secvențe de aminoacizi HCVR / LCVR din SEQ ID NO: 1/5 sau o porțiune de legare a antigenului a acestuia.

Un exemplu nelimitativ de anticorp ANGPTL3 care trebuie utilizat în contextul prezentei invenții include evinacumab, cuprinzând perechea de secvențe de aminoacizi HCVR / LCVR din SEQ ID NO: 10/14 sau o porțiune de legare a antigenului a acestuia.

Regimuri de administrare

Conform anumitor variante ale prezentei invenții, doze multiple de inhibitor ANGPTL8 (adică, o compoziție farmaceutică cuprinzând un inhibitor ANGPTL8) și un inhibitor ANGPTL3 (adică, o compoziție farmaceutică cuprinzând un inhibitor ANGPTL3) pot fi administrate unui subiect peste un curs de timp (de exemplu, pe lângă un regim zilnic de statine terapeutice sau altă terapie de modificare a lipidelor de fond). Metodele conform acestui aspect al invenției cuprind administrarea secvențială la un subiect de doze multiple de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3. Așa cum este utilizat aici, „administrare secvențială” înseamnă că fiecare doză de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3 este administrată subiectului la un moment diferit, de exemplu, în diferite zile separate de un interval predeterminat (de exemplu, ore, zile, săptămâni sau luni). Prezenta invenție include metode care cuprind administrarea secvențială la pacient a unei doze inițiale unice de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3, urmată de una sau mai multe doze secundare de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3 și, opțional, urmată de una sau mai multe doze terțiare de inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3.

Termenii „doză inițială”, „doze secundare” și „doze terțiare” se referă la secvența temporală de administrare a dozelor individuale dintr-o compoziție farmaceutică cuprinzând un inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3. Astfel, „doza inițială” este doza care este administrată la începutul regimului de tratament (denumită și „doza inițială”); „dozele secundare” sunt dozele care se administrează după doza inițială; și „dozele terțiare” sunt dozele care se administrează după dozele secundare. Dozele inițiale, secundare și terțiare pot conține aceeași cantitate de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3, dar, în general, pot diferi între ele în ceea ce privește frecvența administrării. Cu toate acestea, în anumite variante de realizare, cantitatea de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3 conținute în dozele inițiale, secundare și / sau terțiare variază între ele (de exemplu, ajustate în sus sau în jos, după caz) în timpul tratamentului. În anumite variante de realizare, două sau mai multe doze (de exemplu, 2, 3, 4 sau 5) doze sunt administrate la începutul regimului de tratament ca „doze de încărcare” urmate de doze ulterioare care sunt administrate pe o bază mai puțin frecventă (de exemplu, „doze de întreținere”).

Conform exemplurilor de realizare ale prezentei invenții, fiecare doză secundară și / sau terțiară este administrată de la 1 la 26 (de exemplu, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ sau mai mult)

5 săptămâni după doza imediat precedentă. Expresia „doza imediat precedentă”, așa cum este utilizată aici, înseamnă, într-o succesiune de administrări multiple, doza de moleculă care leagă antigenul, care este administrată unui pacient înainte de administrarea următoarei doze în secvența fără dozele intervenind.

10 Metodele conform acestui aspect al invenției pot cuprinde administrarea unui pacient oricărui număr de doze secundare și / sau terțiare de inhibitor ANGPTL8 și inhibitor ANGPTL3. De exemplu, în anumite variante de realizare, doar o singură doză secundară este administrată pacientului. În alte variante, două sau mai multe (de exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze secundare sunt administrate pacientului. La fel, în anumite variante de realizare, doar o singură doză terțiară este administrată pacientului. În alte variante, două sau mai multe (de

15 exemplu, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau mai multe) doze terțiare sunt administrate pacientului. În realizări care implică doze secundare multiple, fiecare doză secundară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze secundare. De exemplu, fiecare doză secundară poate fi administrată pacientului la 1-2 săptămâni, 4, 6, 8 sau mai multe săptămâni după doza imediat precedentă. În mod similar, în realizări care implică doze terțiare multiple, fiecare doză terțiară poate fi administrată la aceeași frecvență ca și celelalte doze terțiare. De exemplu, fiecare doză terțiară poate fi administrată pacientului la 1-2 săptămâni, 4, 6, 8 sau mai multe săptămâni după doza imediat precedentă. Alternativ, frecvența cu care dozele secundare și/sau terțiare sunt administrate unui pacient poate varia pe parcursul regimului de tratament. Frecvența administrării poate fi, de asemenea, ajustată în timpul tratamentului de către un medic, în funcție

25 de nevoile pacientului individual după examinarea clinică.

EXEMPLE

Următoarele exemple sunt prezentate astfel încât să ofere celor cu calificare obișnuită în domeniu o dezvoltare completă și o descriere a modului de realizare și utilizare a metodelor și compozițiilor invenției și nu sunt destinate să limiteze domeniul de vedere al inventatorilor ca invenție a acestora. S-au depus eforturi pentru a asigura precizia cu privire la numerele utilizate (de exemplu, cantități, temperatură etc.), dar ar trebui luate în considerare unele erori experimentale și abateri. Dacă nu se indică altfel, părțile sunt părți în greutate, greutatea moleculară este greutatea moleculară medie, temperatura este în grade Celsius și presiunea este la sau aproape atmosferică.

35 Exemplul 1. Generarea de anticorpi umani împotriva ANGPTL8 uman

Anticorpii anti-ANGPTL8 au fost obținuți prin imunizarea unui șoarec VELOCIMMUNE® (adică, un șoarece proiectat cuprinzând ADN care codifică regiunile variabile ale lanțului ușor imunoglobulină umană și kappa) cu un imunogen care cuprinde un ANGPTL8 uman recombinant exprimat cu un tag Cg terminal IgG2a Fc (Vezi SECV ID NR. 9). Răspunsul imun al anticorpului a fost monitorizat printr-un test imunologic specific ANGPTL8. Când s-a obținut un răspuns imun dorit, mai mulți anticorpi anti-ANGPTL8 complet umani au fost generați din celule B antigen-pozitive așa cum este descris în US 2007 / 0280945A1, încorporat prin referință aici în întregime.

Exemplul de inhibitor ANGPTL8 utilizat în următorul exemplu este anticorpul uman anti-ANGPTL8 desemnat "H4H15341 P". O regiune variabilă cu lanț greu (HCVR) cuprinzând SECV ID NR: 1 și un domeniu variabil cu lanț ușor (LCVR) cuprinzând SECV ID NR: 5; o regiune de determinare a complementarității lanțului greu 1 (HCDR1) cuprinzând SECV ID NR: 2, un HCDR2 cuprinzând SECV ID NR: 3, un HCDR3 cuprinzând SECV ID NR: 4, o regiune de determinare a complementarității lanțului ușor 1 (LCDR1) cuprinzând SECV ID NR: 6, un LCDR2 cuprinzând SECV ID NR: 7 și un LCDR3 cuprinzând SECV ID NR: 8.

50 Exemplul 2. Generarea de anticorpi umani împotriva ANGPTL3 uman

Anticorpii anti-ANGPTL3 umani au fost generați așa cum este descris în brevetul SUA nr. 9.018.356. Exemplul de inhibitor ANGPTL3 utilizat în următorul exemplu este anticorpul uman anti-ANGPTL3 desemnat "H4H1276S", cunoscut și sub numele de "evinacumab". "H4H1276S" are următoarele caracteristici ale secvenței de aminoacizi: o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR) cuprinzând SECV ID NR: 10 și un domeniu variabil al lanțului ușor (LCVR) cuprinzând SECV ID NR: 14; o regiune 1 de determinare a complementarității lanțului greu (HCDR1) cuprinzând SECV ID NR: 11, un HCDR2 cuprinzând SECV ID NR: 12, un HCDR3 cuprinzând SECV ID NR: 13, o regiune de determinare a complementarității lanțului ușor 1 (LCDR1) cuprinzând SECV ID NR: 15, un LCDR2 cuprinzând SECV ID NR: 16 și un LCDR3 cuprinzând SECV ID NR: 17.

60 Exemplul 3: Efect *in vivo* al anticorpului anti-ANGPTL3 asupra nivelurilor de trigliceride și colesterol circulante la șoareci ANGPTL8 Knockout (KO) și Wild Type (WT)

Efectele anticorpului ANGPTL3 H4H1276S asupra trigliceridelor serice (TG) și ale colesterolului total au fost evaluate la șoarecii Angptl8 knockout și la șoarecii de tip sălbatic. Șoarecii au fost pre-săngerati în condiții de post-refed (refed timp de 6 ore după post peste noapte) cu 5 zile înainte de experiment. Șoarecii au fost sortați în grupuri (câte 5 șoareci per anticorp pe genotip) pe baza valorilor inițiale ale TG și ale colesterolului total. Anticorpul, martori cu izotop (hlgG4) cu specificitate irelevantă și H4H1276S (anti-ANGPTL3), au fost administrați prin injecție subcutanată cu doză unică în ziua 0 a studiului la 10 mg / kg. Șoarecii au fost săngerati în zilele 2 și 8 în condiții de repaus alimentar și TG și nivelurile colesterolului total au fost determinate în ser prin ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Mediile au fost calculate pentru fiecare punct de timp. Rezultatele, exprimate ca (medie ± SEM) sunt prezentate în figurile 1 și 2. Figura 1 prezintă rezultatele nivelurilor de trigliceride atât la șoarecii ANGPTL8 KO cât și la șoarecii WT. Figura 2 prezintă rezultatele nivelurilor totale de colesterol atât la șoarecii ANGPTL8 KO cât și la șoarecii WT.

Rezumatul rezultatelor:

Efectul anticorpului ANGPTL3 H4H1276S asupra TG circulant și a nivelurilor colesterolului total a fost evaluat la șoarecii Angptl8 knockout și la șoarecii de tip sălbatic. Tratamentul cu H4H1276S a condus la o reducere semnificativă a nivelului circulant de TG și a colesterolului total la șoarecii de tip sălbatic, în concordanță cu cea raportată anterior (Gusarova și colab., 2015, J. Lipid Res. (2015), Iulie; 56 (7): 1308-17) H4H1276S a cauzat, de asemenea, o reducere semnificativă a nivelurilor de TG la șoarecii knpt-out Angptl8, care au avut deja nivelul de TG inițial redus din cauza ștergerii Angptl8. Colesterolul total a fost, de asemenea, redus semnificativ prin tratamentul H4H1276S al șoarecilor knockout Angptl8. Aceste date sugerează că inhibarea atât a ANGPTL3 cât și a ANGPTL8 poate avea un efect aditiv asupra nivelurilor de TG circulante.

Exemplul 4: Efect in vivo al anti-ANGPTL8 și anti-ANGPTL3 și combinația acestora asupra trigliceridelor circulante (TG) și a colesterolului total (TC) la șoarecii ANGPTL8 umanizați

Efectele tratamentului combinațional al anticorpilor anti-ANGPTL8 și anti-ANGPTL3 asupra trigliceridelor serice (TG) și asupra nivelului total de colesterol au fost evaluate la șoarecii ANGPTL8 umanizați. Șoarecii au fost pre-săngerati cu 6 zile înainte de experiment, în condiții nedorite. Șoarecii au fost sortați în grupuri (câte cinci șoareci pentru fiecare anticorp sau combinație de anticorpi testați) pe baza valorilor lor inițiale de TG și greutatea corporale. Anticorpul au fost administrați prin injecție subcutanată cu doză unică în ziua 0 a studiului: controlul asociat cu izotop (hlgG4) cu specificitate irelevantă, H4H15341 P și H4H1276S au fost administrați în doză de 3 mg / kg și combinația de H4H15341 P și H4H1276S a fost administrată la 2 doze - 1.5mg / kg sau 3mg / kg din fiecare. Șoarecii au fost săngerati (nedeputși) în zilele 1, 4, 8 și 14 după injectarea anticorpilor, TG și nivelurile totale de colesterol au fost determinate în ser prin ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Mediile au fost calculate pentru fiecare punct de timp. Rezultatele, exprimate ca (medie ± SEM) sunt prezentate în figurile 3 și 4. Figura 3 arată efectul asupra trigliceridelor atunci când anticorpul ANGPTL3 sau ANGPTL8 au fost folosiți singuri sau când au fost utilizați în combinație. Măsurătorile au fost făcute în zilele 1, 4, 7 și 14 după administrare. Figura 4 prezintă efectul asupra nivelului total de colesterol atunci când anticorpul ANGPTL3 sau ANGPTL8 au fost folosiți singuri sau când au fost utilizați în combinație. Măsurătorile au fost făcute în zilele 1, 4, 7 și 14 după administrare.

Rezumatul rezultatelor:

Efectul tratamentului combinațional al H4H15341 P (anti-hANGPTL8) și H4H1276S (anti-ANGPTL3) asupra nivelurilor circulante de TG au fost testate la șoarecii ANGPTL8 umanizați. Administrarea de imAb unic sau combinație a dus la o reducere semnificativă a nivelului circulant de TG, unde tratamentul combinațional a arătat un efect aditiv asupra nivelurilor serice de TG, comparativ cu efectele unice de imAb.

Exemplul 5: Studii privind interacțiunea AngPTL3 și AngPTL8

Proteina 3 asemănătoare angiopoietinei (ANGPTL3) și ANGPTL8 sunt proteine secretate și inhibitori ai clearance-ului trigliceridelor plasmatice mediate de lipoprotein lipaza (LPL). A fost studiat modul în care aceste proteine ANGPTL interacționează pentru a regla activitatea LPL pentru a furniza cantități adecvate de acizi grași țesuturilor pentru depozitare sau oxidare. ANGPTL3 inhibă activitatea LPL și crește trigliceridele serice (TG) la șoareci independent de ANGPTL8. Efectele asupra activității LPL și TG serice ar putea fi inversate cu un anticorp blocant ANGPTL3. S-a constatat că ANGPTL8 are un motiv funcțional inhibitor al LPL, dar necesită ANGPTL3 pentru a inhiba LPL și pentru a crește TG seric la șoareci. Mutageneza dirijată la fața locului a arătat că capacitatea ANGPTL8 de a bloca activitatea LPL și de a crește TG seric nu a necesitat ANGPTL3 cu un motiv funcțional inhibitor al LPL. Un anticorp la capătul C-terminal al

ANGPTL8 (vezi Exemplul 6) a inversat inhibirea LPL de către ANGPTL8 în prezența ANGPTL3. Anticorpul nu a perturbat complexul ANGPTL8: ANGPTL3, dar vine în imediată apropiere a motivului inhibitor al LPL în capătul N-terminal al ANGPTL8. În mod colectiv, aceste date arată că ANGPTL8 are un motiv funcțional inhibitor al LPL, dar poate inhiba LPL doar în prezența ANGPTL3 (Haller, J. și colab. Nature Scientific Reports, prezentat 2017).

Exemplul 6: Anticorpul blocant anti-ANGPTL8 inversează inhibirea LPL indusă de ANGPTL8 fără a perturba interacțiunea ANGPTL3

O bibliotecă de peptide de 15 aminoacizi în lungime și cu un offset de un reziduu a fost utilizată pentru a identifica epitopii pentru 8 anticorpi monoclonali care leagă ANGPTL8 uman cu afinitate mare ($K_d = 2.4 \times 10^{10}$ până la $5.8 \times 10^9 M$; Figura 5). Epitopii sunt descriși în Fig. 6a. Anticorpii nu reacționează încrucișat la ANGPTL8 de șoarece și au fost testați pentru eficacitatea in vivo la șoareci ANGPTL8 umanizați (Gusarova și colab., Trimis 2017). În mod surprinzător, doar un anticorp (imAb 7 sau H4H15341 P) a produs o reducere semnificativă a TG seric (Fig. 6b). Acest anticorp se leagă de un epitop (aminoacizii 171-180) din regiunea C-terminală a ANGPTL8 (Fig. 6a). Am raportat recent că acest anticorp scade, de asemenea, TG circulant cu 65% la maimuțele cynomolgus (Gusarova și colab., Trimis 2017). Fig. 6c arată că anticorpul dependent de doză ($EC_{50} = 0,47$ nM) a inversat efectul inhibitor al ANGPTL8 asupra LPL. Acest studiu a fost realizat pe celule HEK293 care co-exprimă ANGPTL3.

Deoarece anticorpul blocant anti-ANGPTL8 se leagă de partea C-terminală și motivul inhibitor al LPL este situat în regiunea N-terminală, am vrut să testăm dacă mediază acțiunea sa prin perturbarea interacțiunii ANGPTL3 și ANGPTL8. În acest scop, am folosit un test de proximitate AlphaLISA în care un semnal este detectat atunci când ANGPTL3 și ANGPTL8 sunt exprimate împreună (Fig. 6d, stânga). Semnalul AlphaLISA a rămas puternic chiar și atunci când au fost testate concentrații mari de anticorp. Aceste date indică faptul că anticorpul blocant anti-ANGPTL8 nu restabilește activitatea LPL prin perturbarea interacțiunii ANGPTL8: ANGPTL3.

Modelarea structurală a prezis recent că ANGPTL8 se pliază astfel încât domeniile N- și C-terminale să fie în imediată apropiere (Siddiqi și colab. (2016) Comput Biol Chem, 61, 210-220). Astfel, am emis ipoteza că anticorpul blocant ANGPTL8 poate proteja steric motivul inhibitor din ANGPTL8 pentru a preveni inhibirea LPL. Pentru a testa această ipoteză, am etichetat anticorpul blocant ANGPTL8 și un anticorp blocant la ANGPTL8 (mAb4 (H4H15347P)), care se leagă de regiunea mijlocie a secvenței proteice ANGPTL8, cu un colorant acceptor FRET. În plus, am etichetat ANGPTL8 în site-ul său N-terminal cu un colorant donator așa cum este descris în Fig. 6e. Când ANGPTL8 marcat a fost co-exprimat cu ANGPTL3 în celulele HEK293 și testat cu anticorpii marcați, am detectat un semnal TR-FRET mult mai puternic cu anticorpul blocant ANGPTL8 direcționat către fragmentul C-terminal comparativ cu cel al anticorpului nebloant (Fig. 6f). Aceste rezultate indică faptul că capetele N- și C ale ANGPTL8 sunt situate în imediată apropiere și că anticorpul blocant ANGPTL8 poate împiedica steric legarea motivului inhibitor al ANGPTL8 de LPL.

Materiale și metode:

Cartografierea epitopului. Cartografierea epitopului a fost realizată de PEPSCAN PRESTO BE. Pe scurt, sinteza standard a peptidelor Fmoc a fost utilizată pentru a sintetiza peptidele lungi de 15 aminoacizi cu 14 suprapuneri de aminoacizi. Legarea anticorpilor la fiecare peptidă a fost testată într-un ELISA pe bază de PEPSCAN: anticorpul primar a fost incubat la 1 μ g/ml (peste noapte la 4 ° C) urmat de incubare cu conjugat HRP anti-capră uman (1 oră la 25 ° C). După spălare, s-a adăugat substratul peroxidazei 2,2'-azino-di-3etilbenzotiazolină sulfonat (ABTS) și 10 μ l/ml de 3% H₂O₂, iar dezvoltarea culorii a fost măsurată folosind un aparat de fotografiat cu perechi de încărcare.

Analiza AlphaLISA. Testul a fost efectuat într-un format de placă cu 384 godeuri la temperatura camerei. Mediul celular CHO-K1 (2,5 μ l) din celule transfectate cu un vector care conține ANGPTL3-myc și ANGPTL8-V5 sau vector gol a fost incubat cu cantitățile indicate de anticorpi timp de 1 oră într-un volum final de 20 μ l. Apoi, s-au adăugat margele anti-V5 Alpha (PerkinElmer) și s-au incubat timp de încă 30 de minute, după o incubare de 1 h cu anticorp anti-mic biotinitat (generat în casă) și margele donatoare de streptavidină Alpha (PerkinElmer). Toate diluțiile au fost efectuate în tampon Hi-Block (PerkinElmer), concentrația finală a fost de 10 ng/ml pentru margele și 10 nM pentru anticorp biotinitat în volum total de 50 μ l. Semnalul AlphaLISA a fost măsurat într-un Reader Multilabel Envision® (PerkinElmer) urmând instrucțiunile producătorului.

Experiment anticorp TR-FRET. Celulele HEK293T au fost co-transfectate cu o plasmidă care codifică ANGPTL3 și o plasmidă care codifică ANGPTL8 N-terminal marcat cu Avi utilizând reactivul de transfecție TransIT-LT1. Mediul celular a fost colectat după 72 de ore, concentrat de 20x folosind o unitate de filtrare Centriprep (Millipore) cu o intrerupere moleculară

- de 10 kDa și biotinilată directă pe site utilizând biotină-proteină ligază BirA (Aviditate) (Fairhead & Howarth, 2015) urmand instrucțiunile furnizorului, apoi dializate împotriva PBS. Biotinilarea Avi-ANGPTL8 a fost confirmată prin Western blot folosind streptavidin-HRP pentru detectare. Anticorpul a fost etichetat utilizând trusa de etichetare a anticorpilor Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen). Au fost determinate concentrațiile de anticorpi și coloranți ectrofotometric și rapoarte medicament-anticorpi de 5: 2 au fost utilizate pentru toate experimentele. TR- FRET a fost realizat într-un format de placă cu 384 de godeuri. Concentrația finală a fost 31,3 nM Europium-streptavidină, 25 nM anticorp marcat, 50% Biotin-Avi-ANGPTL8 în tampon de diluare TR-FRET (PerkinElmer). TR-FRET a fost măsurat folosind Envision® Multilabel Reader (PerkinElmer), filtru de excitație 340/30 nm, filtru de emisii 1 - 615 / 8,5 nm, filtru de emisii 2 - 665 / 7,5 nm, oglindă dicroică D400 / D630, măsurată într-o intarziere de 100 ms și un timp de fereastră de 2 ms.

LISTA SECVENȚELOR

[0157]

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> METODE DE TRATARE A HIPERLIPIDEMIEI CU UN INHIBITOR ANGPTL8 ȘI UN INHIBITOR ANGPTL3

<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 versiunea 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="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> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="HCDR1"

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Asn Asn His Glu
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="HCDR2"

<400> 3

Ile Ser Ser Ser Gly Asn Thr Val
1 5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="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> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="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			

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> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="LCDRI"

<400> 6

Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
1 5

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursa
<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"
<220>
<221> sursa
<223> /note="LCDR2"
<400> 7

Asp Ala Ser
1

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursa
<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"
<220>
<221> sursa
<223> /note="LCDR3"
<400> 8

Gln Gln Tyr Glu Asn Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 413
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
<221> sursa
<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"
<220>
<221> sursa
<223> /note="hANGPTL8-mFc aa 1-177: aminoacizii 22-198 din NP_061157.3 aa 178-413: linker GPG și șoarece Eticheta Fc IgG2a"
<400> 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

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 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

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> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="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
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> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="Evinacumab HCDR1"

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="Evinacumab HCDR2"

<400> 12

Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr
1				5			

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="Evinacumab HCDR3"

<400> 13

Ala	Lys	Asp	Leu	Arg	Asn	Thr	Ile	Phe	Gly	Val	Val	Ile	Pro	Asp	Ala
1			5						10					15	

Phe Asp Ile

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="Evinacumab LCVR"

<400> 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> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="Evinacumab LCDR1"

<400> 15

Gln Ser Ile Arg Ser Trp
 1 5

<210> 16

<211> 3

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<221> sursa

<223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"

<220>

<221> sursa

<223> /note="Evinacumab LCDR2"

<400> 16

Lys Ala Ser
 1

<210> 17

<211> 9

<212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursa
 <223> /note="Descrierea secvenței artificiale: peptidă sintetică"
 <220>
 <221> sursa
 <223> /note="Evinacumab LCDR3"
 <400> 17

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

<210> 18
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <221> sursa
 <223> /note="Descrierea secvenței artificiale: polipeptidă sintetică"
 <220>
 <221> sursa
 <223> /note="hANGPTL3"
 <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

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

<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
 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

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- REN ZHANG: "The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking", OPEN BIOLOGY, vol. 6, no. 4, 1 April 2016 (2016-04-01), page 150272, XP055387866, DOI: 10.1098/rsob.150272
- WO-A1-2012/174178
- ZHIYAO FU ET AL: "A lipasin/Angptl8 monoclonal antibody lowers mouse serum triglycerides involving increased postprandial activity of the cardiac lipoprotein lipase", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, no. 1, 21 December 2015 (2015-12-21), XP055360939, DOI: 10.1038/srep18502
- WO-A1-2017/027316
- HANSON ROBERT L ET AL: "The Arg59Trp variant in ANGPTL8 (betatrophin) is associated with total and HDL-cholesterol in American Indians and Mexican Americans and differentially affects cleavage of ANGPTL3", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 118, no. 2, 19 April 2016 (2016-04-19), pages 128-137, XP029548394, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2016.04.007
- JORGE F. HALLER ET AL: "ANGPTL8 requires ANGPTL3 to inhibit lipoprotein lipase and plasma triglyceride clearance", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 58, no. 6, 1 June 2017 (2017-06-01), pages 1166-1173, XP055387875, US ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/jlr.M075689

(57) Revendicări:

1. Un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui pacient care suferă de hiperlipidemie, în combinație cu un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3), în care inhibitorul ANGPTL8 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL8 și cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 2, un HCDR2 având aminoacidul. secvența din SECV ID NR: 3, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 6, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 7 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 8; și inhibitorul ANGPTL3 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 11, un HCDR2. având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 12, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 13, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15, un LCDR2 având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 16 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi SECV ID NR: 17.

2. Un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3) pentru utilizare într-o metodă de tratare a unui pacient care suferă de hiperlipidemie, în combinație cu un inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8), în care inhibitorul ANGPTL3 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL3 și cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 11, un HCDR2 având aminoacidul. secvența din SECV ID NR: 12, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 13, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 16 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 17; și inhibitorul ANGPTL8 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 2, un HCDR2. având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 3, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 6, un LCDR2 având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 7 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi SECV ID NR: 18

3. O compoziție farmaceutică pentru utilizare în tratamentul unui pacient care suferă de hiperlipidemie, în care compoziția cuprinde o cantitate eficientă terapeutică dintr-o compoziție a unui inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 8 (ANGPTL8) și a unui inhibitor al proteinei asemănătoare angiopoietinei 3 (ANGPTL3), în care ANGPTL8 este un anticorp sau un

fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL8 și cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 2, un HCDR2 având aminoacidul. secvența din SECV ID NR: 3, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 4, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 6, un LCDR2 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 7 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 8; și inhibitorul ANGPTL3 este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde un lanț greu CDR1 (HCDR1) având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 11, un HCDR2. având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 12, un HCDR3 având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 13, un lanț ușor CDR1 (LCDR1) având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 15, un LCDR2 având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 16 și un LCDR3 având secvența de aminoacizi SECV ID NR: 17.

4. Inhibitorul ANGPTL8 pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, inhibitorul ANGPTL3 pentru utilizare în metoda 2, sau compoziția farmaceutică pentru utilizare în metoda 3, în care

(a) hiperlipidemia este hiperlipidemie familială sau dobândită, opțional în care (i) hiperlipidemia familială este hipercolesterolemia selectată din grupul constând din hipercolesterolemia familială heterozigotă (HeFH) și hipercolesterolemia familială homozigotă (HoFH) sau (ii) hiperlipidemia dobândită este rezultatul consumului de alcool excesiv, al obezității, al efectelor secundare ale medicamentelor (de ex, hormoni sau steroizi), al diabetului, al bolilor de rinichi, al glandei tiroide subactive sau a sarcinii; sau

(b) hiperlipidemia este selectată din grupul constând din hiperlipoproteinemie, hipercolesterolemie, hipertrigliceridemie, și hipercolesterolemie.

5. Inhibitorul ANGPTL8 pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, inhibitorul ANGPTL3 pentru utilizare în metoda 2, sau compoziția farmaceutică pentru utilizare în metoda 3, în care anticorpul, sau fragmentul de legare al antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL8 cuprinde o secvență HCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 1 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 5.

6. Inhibitorul ANGPTL8 pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, sau inhibitorul ANGPTL3 pentru utilizare în metoda 2, în care inhibitorul ANGPTL8 este administrat pacientului subcutanat sau intravenos.

7. Inhibitorul ANGPTL8 pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, inhibitorul ANGPTL3 pentru utilizare în metoda 2, sau compoziția farmaceutică pentru utilizare în metoda 3, în care

(a) anticorpul, sau fragmentul de legare al antigenului acestuia, care se leagă în mod specific la ANGPTL3 cuprinde o HCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR: 10 și un LCVR având secvența de aminoacizi din SECV ID NR.: 14; și/sau

(b) anticorpul ANGPTL3 este evinacumab.

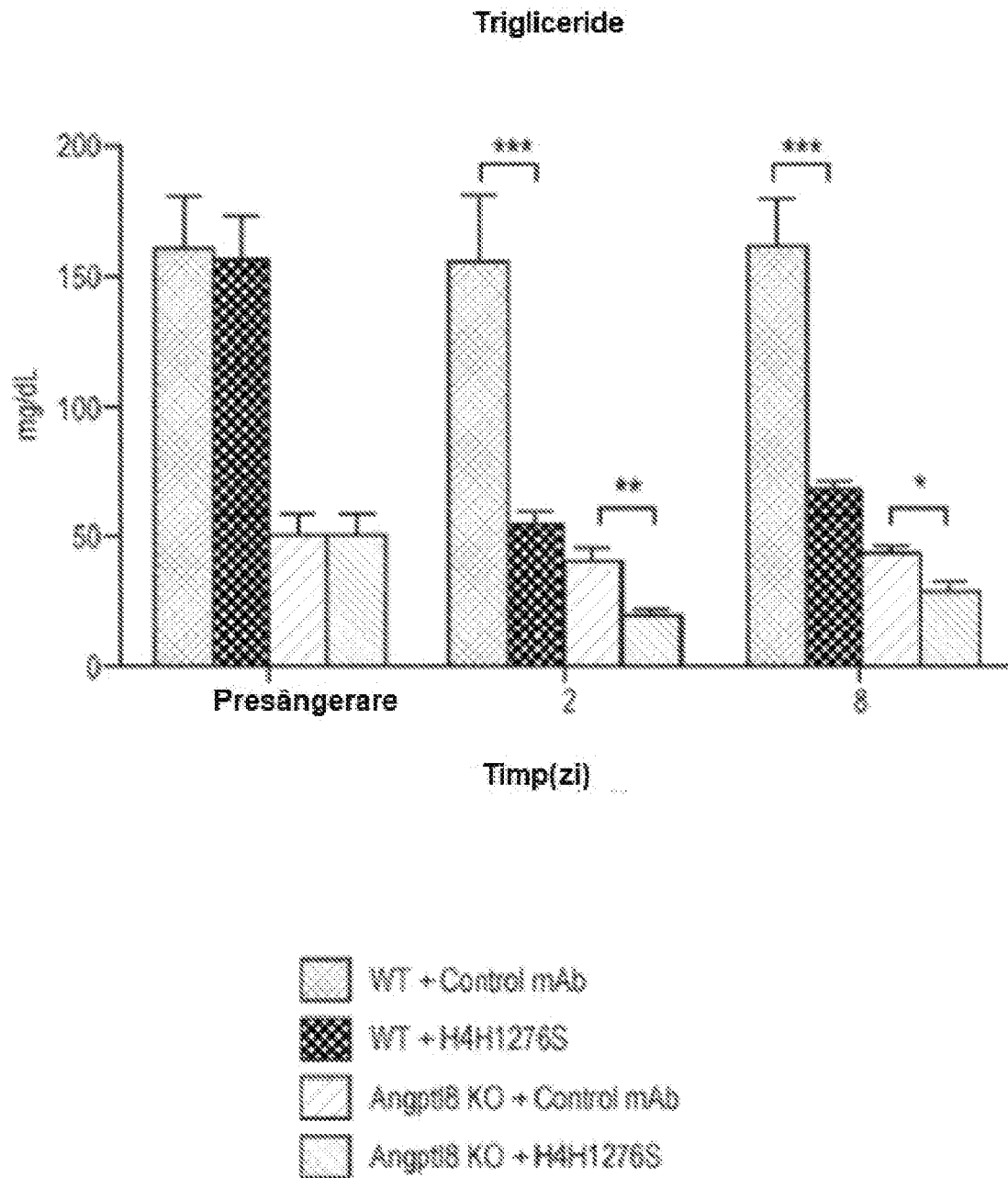
8. Inhibitorul ANGPTL8 pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, sau inhibitorul ANGPTL3 pentru utilizare în metoda 2, în care anticorpul ANGPTL3 este administrat pacientului subcutanat sau intravenos.

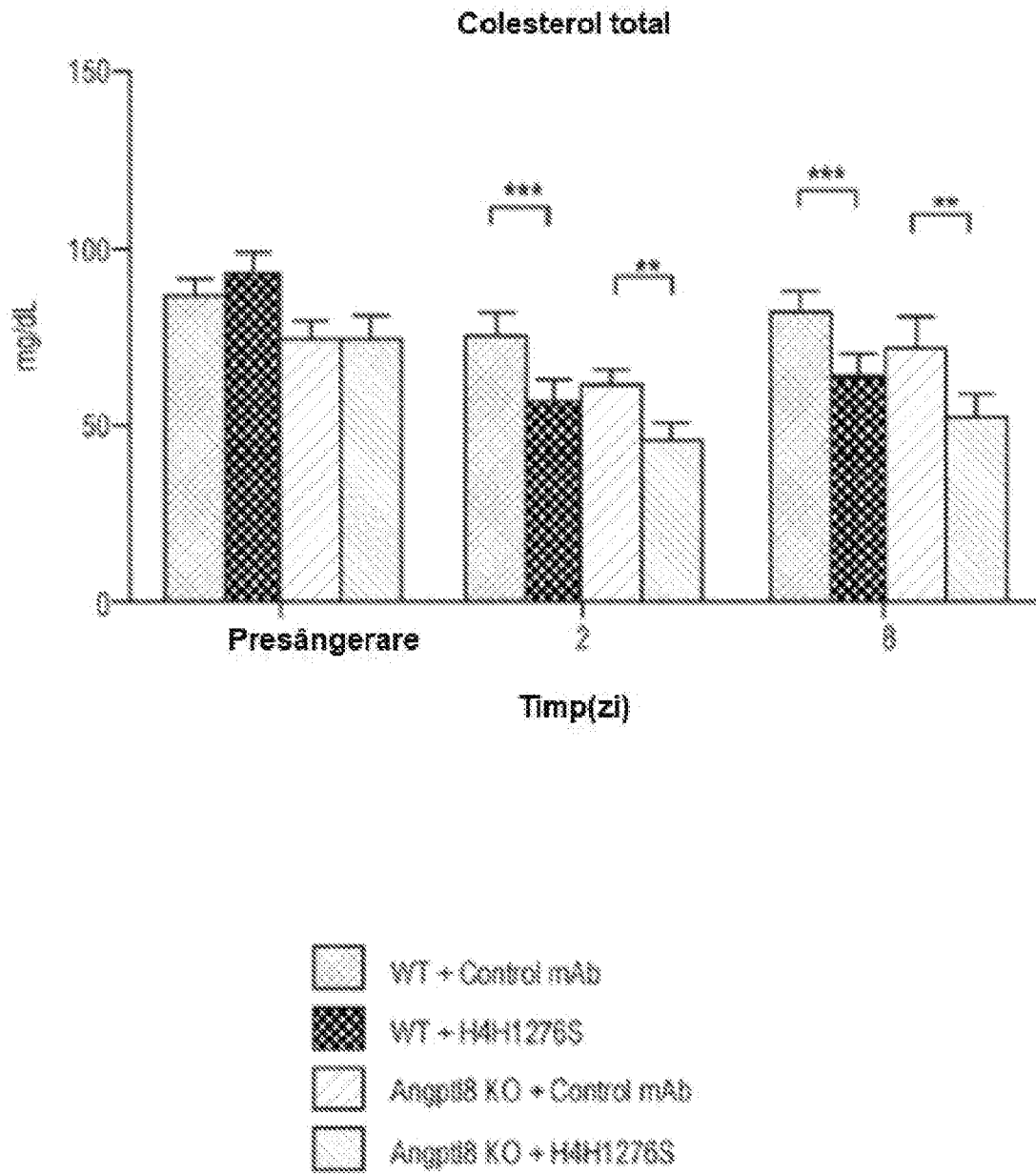
9. Inhibitorul ANGPTL8 pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, sau inhibitorul ANGPTL3 pentru utilizare în metoda 2, în care

(a) inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3 sunt administrate concomitent sau secvențial; sau

(b) inhibitorul ANGPTL8 și inhibitorul ANGPTL3 sunt administrate la concentrații eficiente terapeutic în compoziții farmaceutice separate sau sunt co-formulate într-o singură compoziție farmaceutică.

10. Compoziția farmaceutică pentru utilizare în metoda conform revendicării 3, în care compoziția farmaceutică este administrată pacientului subcutanat sau intravenos.

**FIGURA 1**

**FIGURA 2**

Trigliceride

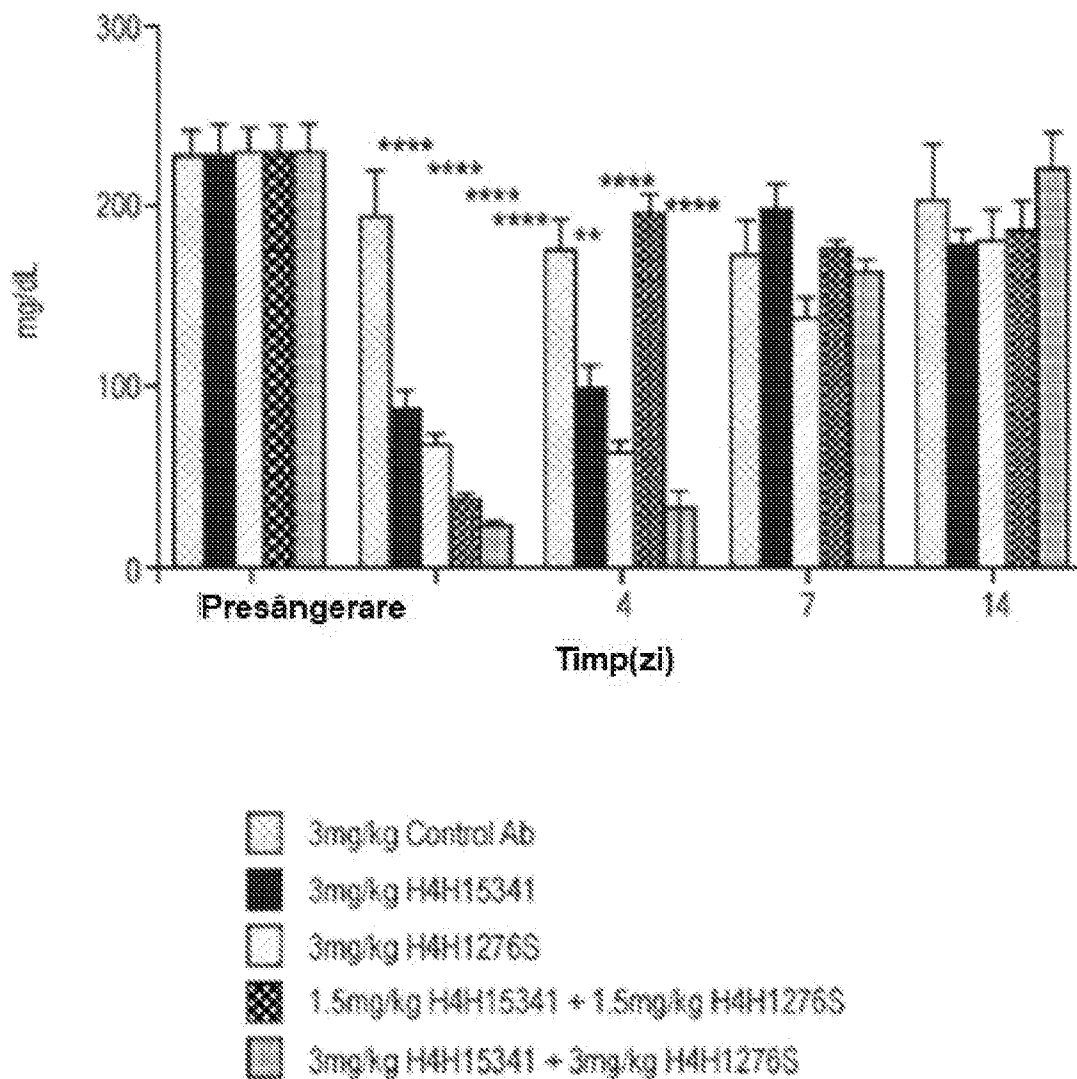


FIGURA 3

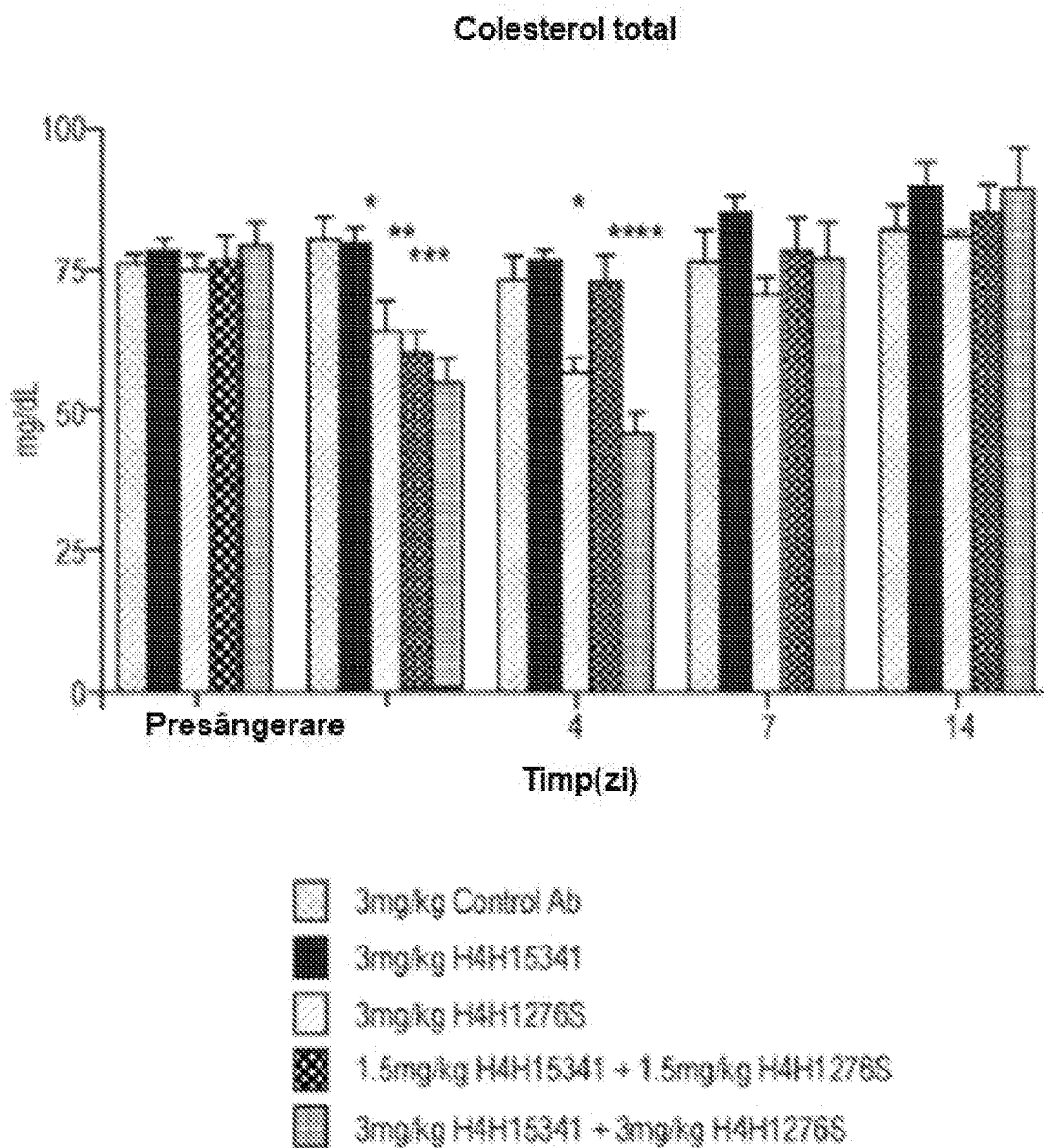


FIGURA 4

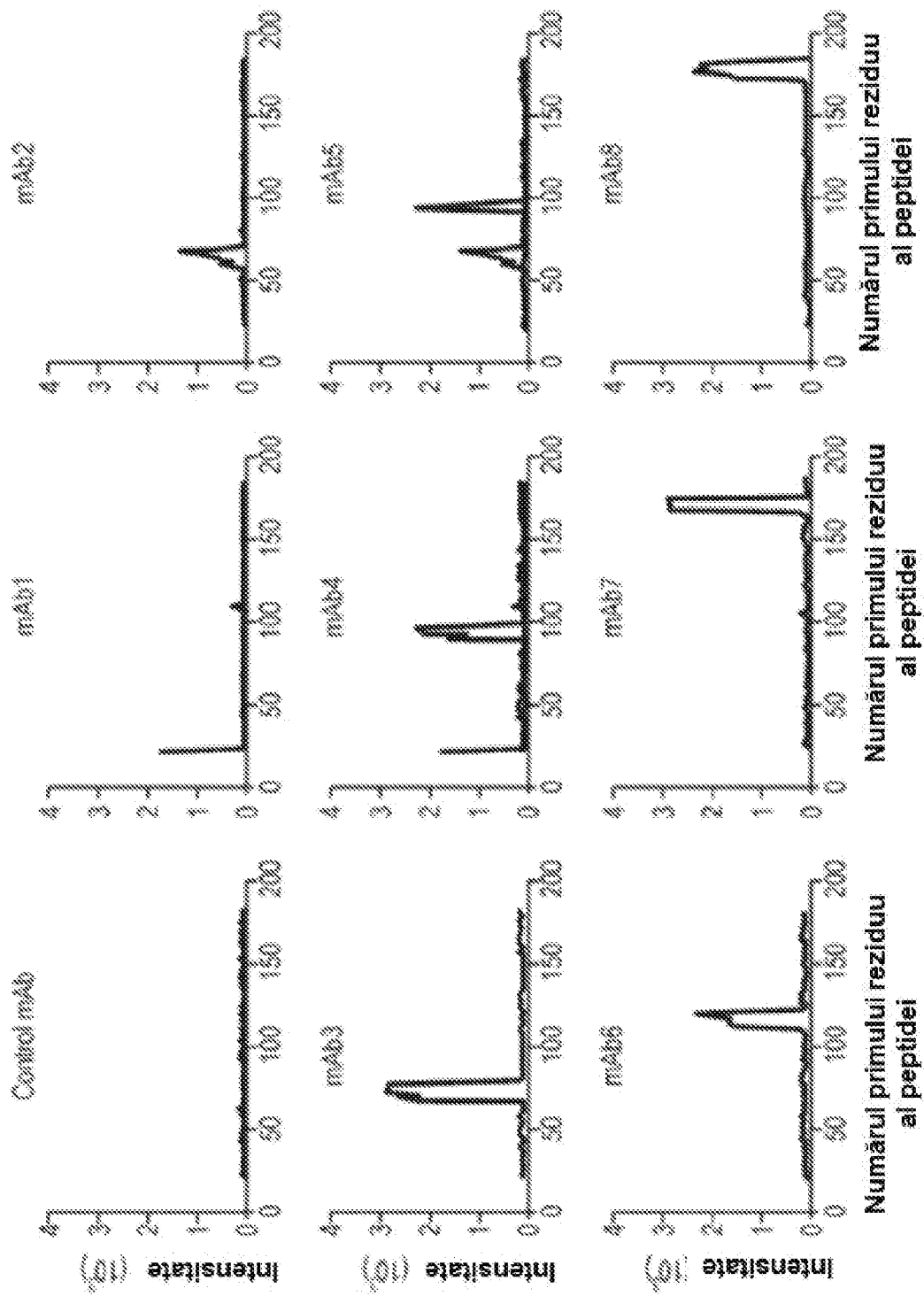


FIGURA 5

Figura 6f