

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 819 866**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2015 PCT/US2015/053700**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16054494**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2015 E 15848061 (6)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020 EP 3201225**

(54) Título: **Polipéptido ANGPTL8 y su uso para el tratamiento de condiciones asociadas con triglicéridos elevados**

(30) Prioridad:

03.10.2014 US 201462059682 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2021

(73) Titular/es:

NGM BIOPHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
333 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

(72) Inventor/es:

LIU, ZHONGHAO y
DING, XUNSHAN

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 819 866 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptido ANGPTL8 y su uso para el tratamiento de condiciones asociadas con triglicéridos elevados

Introducción

Según la Asociación Estadounidense del Corazón, se estima que alrededor de un tercio de los adultos estadounidenses tienen niveles elevados de triglicéridos superiores a 150 miligramos por decilitro (mg/dl) (Miller et al. (2011) Circulation. 123:2292-2333). A partir de una muestra de sujetos de la Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición, se estima además que un promedio del 1,7% de la población nacional tenía hipertrigliceridemia grave (caracterizada como 500 a 2000 mg / dl) entre 2001 y 2006 (Christian et al. (2011) Am J Cardiol. 107(6):891-7).

Los niveles elevados de triglicéridos en sangre y la hipertrigliceridemia son factores que contribuyen significativamente al aumento del riesgo de enfermedad cardíaca, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular y aterosclerosis. Los niveles elevados de triglicéridos también pueden ser un signo y un factor que contribuye a las condiciones adversas que aumentan el riesgo general de enfermedad cardíaca de una persona, como obesidad, síndrome metabólico, exceso de grasa corporal, presión arterial alta, azúcar alta en sangre y niveles anormales de colesterol. Además, los niveles altos de triglicéridos contribuyen a un mayor deterioro de la salud de los sujetos con diabetes tipo 2 mal controlada, hipotiroidismo, enfermedad hepática, enfermedad renal y trastornos metabólicos genéticos. Para complicar aún más el tratamiento de las afecciones asociadas, los niveles elevados de triglicéridos son un efecto secundario común de los medicamentos recetados habitualmente, tal como betabloqueantes, anticonceptivos, diuréticos, los esteroides y ciertos tratamientos contra el cáncer, tal como tamoxifeno.

consecuencia, reducir los niveles de triglicéridos, en particular la reducción de los niveles elevados de triglicéridos a intervalos normales puede tener un impacto significativo en la salud y el bienestar de un sujeto. La reducción de los niveles de triglicéridos se asocia con un menor riesgo de enfermedad cardíaca, ataque cardíaco, accidente cerebrovascular y aterosclerosis. Además, mantener los niveles normales de triglicéridos se asocia con un manejo eficaz de la obesidad, los síndromes metabólicos, la presión arterial alta, el colesterol anormal, la diabetes, el hipertiroidismo, las enfermedades hepáticas, las enfermedades renales y los trastornos metabólicos genéticos. Además, reducir los niveles de triglicéridos y/o prevenir su aumento puede permitir que un sujeto comience o continúe un tratamiento que de otra manera podría aumentar de manera adversa los niveles de triglicéridos, por ejemplo, tratamientos con medicamentos que se sabe que aumentan los niveles de triglicéridos, incluidos betabloqueantes, anticonceptivos, diuréticos, esteroides y ciertos tratamientos contra el cáncer, tal como el tamoxifeno.

cambios en el estilo de vida, tales como reducir la ingesta de triglicéridos o colesterol en la dieta y aumentar el ejercicio, pueden reducir los niveles elevados de triglicéridos o colesterol. Sin embargo, los cambios de estilo de vida no son eficaces para todos los pacientes. Algunos pacientes no son físicamente capaces de realizar ciertos cambios en el estilo de vida, tales como aumentar el ejercicio, debido a otros factores de salud que complican la salud. Además, los regímenes de cambio de estilo de vida, tales como los programas de ejercicio y las dietas, a menudo están sujetos a una mala adherencia del paciente, lo que puede provocar un aumento de los niveles de triglicéridos y/o colesterol a lo largo del tiempo. Reducir farmacológicamente los niveles de triglicéridos y/o colesterol en sujetos que son incapaces de realizar inicialmente cambios saludables en el estilo de vida no solo proporcionan los beneficios directos de niveles reducidos de triglicéridos, sino que también pueden aumentar la condición del paciente a un estado tal que se pueden iniciar ciertos cambios en el estilo de vida. Asimismo, la reducción farmacológica de los niveles triglicéridos y/o colesterol en sujetos capaces de realizar o mantener ciertos cambios en el estilo de vida, pero que no desean hacerlo, también pueden proporcionar el incentivo inicial para comenzar o adherirse a tales cambios en el estilo de vida, como, p. ej., regímenes de ejercicio y hábitos alimenticios saludables.

Compendio

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se proporcionan métodos y composiciones para reducir los niveles de triglicéridos en un sujeto. Los métodos incluyen un fragmento de ANGPTL8 para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar niveles elevados de triglicéridos.

En ciertos casos, se proporciona el tratamiento para reducir los niveles de triglicéridos en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar niveles elevados de triglicéridos. El tratamiento puede incluir administrar al sujeto un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1), donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-74 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1), y donde el polipéptido se administra en una cantidad eficaz para reducir los niveles de triglicéridos en el sujeto.

En ciertos casos, la secuencia de aminoácidos contigua puede tener al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1).

En ciertos casos, la secuencia de aminoácidos contigua tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1).

En ciertos casos, un polipéptido heterólogo se puede conjugar al extremo N-terminal o al C-terminal del polipéptido. El polipéptido heterólogo puede ser albúmina, tal como albúmina de suero humano, o inmunoglobulina Fc. El polipéptido heterólogo se puede conjugar con el polipéptido mediante una secuencia enlazadora. En ciertos casos, la secuencia enlazadora puede ser una secuencia enlazadora escindible. En otros casos, la secuencia enlazadora puede ser una secuencia enlazadora no escindible.

En métodos ejemplares, la administración puede reducir los niveles de triglicéridos en al menos un 10% en comparación con los niveles de triglicéridos en el sujeto antes de la administración del polipéptido. Por ejemplo, la administración puede reducir los niveles de triglicéridos en al menos un 20% o un 30% en comparación con los niveles de triglicéridos en el sujeto antes de la administración del polipéptido.

El sujeto puede tener sobrepeso, obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular, hipotiroidismo o una combinación de los mismos.

Métodos y composiciones para reducir los niveles de colesterol total y colesterol LDL en un sujeto. Los métodos incluyen administrar un fragmento de ANGPTL8 a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar colesterol total o colesterol LDL elevado.

En ciertos casos, se divulga un método para reducir los niveles de colesterol total en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar niveles elevados de colesterol total. El método incluye un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO.1), donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-70 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1), para la administración a un sujeto, el polipéptido se administra en una cantidad eficaz para reducir los niveles de colesterol total en el sujeto.

En ciertos casos, la administración puede reducir los niveles de colesterol total en al menos 5%, 10%, 20%, o más en comparación con los niveles de colesterol total en el sujeto antes de la administración del polipéptido.

También se divulga un método para reducir los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar niveles elevados de colesterol LDL. El método puede incluir un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO.1), donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-70 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1), para la administración a un sujeto en donde el polipéptido se administra en una cantidad eficaz para reducir los niveles de colesterol LDL en el sujeto.

En casos ejemplares, la administración puede reducir los niveles de colesterol LDL en al menos 5%, 10%, 15%, o más en comparación con los niveles de colesterol LDL en el sujeto antes de la administración del polipéptido.

La secuencia de aminoácidos contigua del polipéptido puede tener al menos 90%, al menos 95%, 97%, 99%, o más identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1).

Un polipéptido heterólogo se puede conjugar al extremo N-terminal o al C-terminal del polipéptido en casos ejemplares. El polipéptido heterólogo es albúmina, p. ej., albúmina de suero humano o inmunoglobulina Fc. El polipéptido heterólogo se puede conjugar con el polipéptido a través de una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible o no escindible.

Los sujetos ejemplares incluyen un sujeto que tiene sobrepeso, obesidad, diabetes, hipotiroidismo, enfermedad cardiovascular o una combinación de estas afecciones.

45 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 indica que la sobreexpresión de ANGPTL8 aumentó los triglicéridos en plasma en ratones.

FIGS. 2A-2C indican que una variante de ANGPTL8 (ANGPTL8-V2) suprime los triglicéridos en plasma en ratones.

FIG. 2A. Diseño de la construcción: FIG. 2B. Niveles de triglicéridos en plasma antes de la sobreexpresión; FIG. 2C. Niveles de triglicéridos en plasma después de 2 semanas de sobreexpresión por AAV.

FIG. 3 indica que la sobreexpresión de ANGPTL8 y ANGPTL8-V2 afectó la absorción de triglicéridos y/o aclaramiento en ratones.

FIG. 4 indica que la sobreexpresión de ANGPTL8-V2 redujo la secreción de VLDL en ratones.

Definiciones

Los términos "paciente" o "sujeto", como se usan indistintamente en el presente documento en el contexto de la terapia, se refieren a un animal humano y no humano, como receptor de una terapia o atención preventiva.

5 Los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a un tipo de acción (tal como administrar un agente, p. ej., un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido) iniciado luego de que se ha diagnosticado, observado y similares una enfermedad, trastorno o afección o un síntoma de estos, para eliminar, reducir, suprimir, mitigar o mejorar, ya sea de forma temporal o permanente, al menos una de las causas subyacentes de una enfermedad, trastorno o afección que aqueja a un sujeto, o al menos uno de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, afección que aqueja a un sujeto.

10 Por tanto, el tratamiento incluye inhibir (p. ej., detener el desarrollo o el desarrollo adicional de la enfermedad, trastorno o afección, o los síntomas clínicos asociados con esta) una enfermedad activa.

El término "con necesidad de tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a un juicio emitido por un médico u otro cuidador de que un sujeto requiere o se beneficiará del tratamiento. Este juicio se basa en una variedad de factores que se encuentran en el ámbito de la experiencia del médico o cuidador.

15 5 Los términos "prevenir", "que previene", "prevención" y similares se refieren a un tipo de acción (tal como administrar un agente, p. ej., un polipéptido o una composición farmacéutica que comprende un polipéptido) iniciada en una manera (por ejemplo, antes del inicio de una enfermedad, trastorno, afección o síntoma de estos) para prevenir, suprimir, inhibir o reducir, ya sea de forma temporal o permanente, el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad, trastorno, afección o similar (tal como se determina, por ejemplo, por la ausencia de síntomas clínicos) o demorar el inicio de este, generalmente en el contexto de una sujeto predisposto a tener una enfermedad, trastorno o afección particular.

En determinados casos, las expresiones también se refieren a ralentizar la evolución de la enfermedad, trastorno o afección, o inhibir la evolución de los mismos a un estado nocivo o de otro modo indeseado.

20 25 El término "con necesidad de prevención", como se usa en el presente documento, se refiere a un juicio emitido por un médico u otro cuidador de que un sujeto requiere o se beneficiará de la atención preventiva. Este juicio se basa en una variedad de factores que se encuentran en el ámbito de la experiencia de un médico o cuidador.

30 35 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la administración de un agente a un sujeto, ya sea solo o como parte de una composición farmacéutica y en una sola dosis o como parte de una serie de dosis, en una cantidad que es capaz de tener un efecto positivo detectable sobre cualquier síntoma, aspecto o características de una enfermedad, trastorno o afección cuando se administra a un paciente. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar midiendo los efectos fisiológicos relevantes. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede ajustar en relación con el régimen de dosificación y el análisis de diagnóstico de la afección del sujeto y similares.

40 45 La frase "en una cantidad suficiente para efectuar un cambio" significa que hay una diferencia detectable entre un nivel de un indicador medido antes (p. ej., un nivel de punto de referencia) y después de la administración de una terapia particular.

Como se usa en el presente documento, "homólogos" o "variantes" se refieren a secuencias de proteínas o ADN que son similares en función de sus secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, respectivamente. Las variantes y los homólogos abarcan secuencias de ADN de origen natural y proteínas codificadas de este modo y sus isoformas. Los homólogos también incluyen variantes alélicas o de empalme conocidas de una proteína/gen. Los términos también abarcan secuencias de ácido nucleico que varían en una o más bases con respecto a la secuencia de ADN de origen natural, pero aun así se traducen en una secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína de origen natural debido a la degeneración del código genético. Las variantes y los homólogos de origen no natural también puede hacer referencia a los que difieren de las secuencias de origen natural por una o más sustituciones conservadoras y/o etiquetas y/o conjugados.

50 55 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados genéticamente y codificados no genéticamente, aminoácidos modificados o derivados químicamente o bioquímicamente, y polipéptidos que tienen cadenas principales de polipéptidos modificados. El término incluye proteínas de fusión, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, proteínas de fusión con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos de metionina en el extremo N-terminal; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares.

Los términos "molécula de ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos lineales y circulares, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, vectores, sondas, cebadores y similares.

El término "heterólogo" se refiere a dos componentes que están definidos por estructuras derivadas de diferentes fuentes. Por ejemplo, en el contexto de un polipéptido, donde "heterólogo" puede incluir secuencias de aminoácidos operativamente unidas que se derivan de diferentes polipéptidos (p. ej., un primer componente que consiste en un péptido o proteína marcado o un segundo componente derivado de un polipéptido ANGPTL8). De manera similar, "heterólogo" en el contexto de un polinucleótido que codifica un polipéptido químico, incluye secuencias de ácido nucleico operativamente unidas que se pueden derivar de diferentes genes (por ejemplo, un primer componente de un ácido nucleico que codifica un péptido según una realización divulgada en el presente documento y un segundo componente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido transportador). Otros ácidos nucleicos "heterólogos" ejemplares incluyen construcciones de expresión en las que un ácido nucleico que comprende una secuencia de codificación está operativamente unido a un elemento regulador (p. ej., un promotor) que es de un origen genético diferente del de la secuencia de codificación (p. ej., para proporcionar para la expresión en una célula huésped de interés, que puede ser de origen genético diferente que el promotor, la secuencia de codificación o ambas). Por ejemplo, se dice que un promotor T7 operativamente unido a un polinucleótido que codifica un polipéptido ANGPTL8 o dominio de este es un ácido nucleico heterólogo. "Heterólogo" en el contexto de las células recombinantes, se puede referir a la presencia de un ácido nucleico (o producto génico, tal como un polipéptido) que es de un origen genético diferente al de la célula huésped en donde está presente.

El término "operativamente unido" se refiere al enlace entre moléculas para proporcionar una función deseada. Por ejemplo, "operativamente unido" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a un enlace funcional entre ácidos nucleicos para proporcionar una función deseada, tal como transcripción, traducción y similares, p. ej., un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor o matriz de sitios de unión de factores de transcripción) y un segundo polinucleótido, en donde la secuencia de control de expresión afecta la transcripción y/o traducción del segundo polinucleótido. En el contexto de un polipéptido, "operativamente unido" se refiere a un enlace funcional entre secuencias de aminoácidos (p. ej., de diferentes dominios) para proporcionar una actividad descrita del polipéptido.

Como se usa en el presente documento en el contexto de la estructura de un polipéptido, "extremo N" (o "extremo amino") y "extremo C" (o "extremo carboxilo") se refieren a los extremos carboxilo y amino de extremo polipéptido, respectivamente, mientras que los términos "N-terminal" y "C-terminal" se refieren a posiciones relativas en la secuencia de aminoácidos del polipéptido hacia el extremo N y el extremo C, respectivamente, y pueden incluir los residuos en el extremo N y el extremo C, respectivamente.

"Derivado de", en el contexto de una secuencia de aminoácidos o una secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica ANGPTL8 que ocurre de manera natural), pretende indicar que el polipéptido o ácido nucleico tiene una secuencia que se basa en la de un polipéptido o ácido nucleico de referencia (por ejemplo, un polipéptido ANGPTL8 de origen natural o un ácido nucleico de codificación de ANGPTL8), y no pretende ser limitante en cuanto a la fuente o procedimiento en donde se produce la proteína o el ácido nucleico.

"Aislado" en el contexto de un polipéptido, se refiere a un polipéptido de interés que, si es de origen natural, se encuentra en un entorno diferente de aquel en donde se puede producir de forma natural. Se entiende que "aislado" incluye polipéptidos que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas para el polipéptido de interés y/o en las que el polipéptido de interés está purificado parcial o sustancialmente. Cuando la proteína no se produce de forma natural, "aislado" indica que la proteína ha sido separado de un entorno en donde se hizo por medios sintéticos o recombinantes.

«Enriquecida» significa que una muestra se manipula de forma no natural (p. ej., a manos de un médico o un clínico) de forma tal que un compuesto de interés se encuentre presente en una concentración mayor (p. ej., al menos tres veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 64 veces mayor o más) que la concentración de la proteína en la muestra inicial, tal como una muestra biológica (p. ej., una muestra en donde el compuesto es de origen natural o en donde se encuentra presente luego de la administración) o en la cual se realizó el compuesto (p. ej., como en una proteína bacteriana y similares).

"Sustancialmente puro" indica que un agente (p. ej., polipéptido) conforma más de aproximadamente el 50% del contenido total de la composición (p. ej.; proteína total de la composición) y, normalmente, más de aproximadamente el 60% del contenido de proteína total. Más normalmente, "sustancialmente puro" se refiere a composiciones en las que al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 90% o más de la composición total es el componente de interés (p. ej., 95% de la proteína total). Preferiblemente, la proteína constituirá más de aproximadamente 90%, y más preferiblemente, más de aproximadamente el 95% de la proteína total en la composición.

El término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que una vez transcrita y traducida produce una proteína, por ejemplo, *in vivo*, cuando se coloca bajo el control de elementos reguladores apropiados. Una secuencia codificante como se usa en el presente documento puede tener un ORF continuo o puede tener un ORF interrumpido por la presencia de intrones o secuencias no codificantes. En esta realización, las secuencias no codificantes se cortan del pre-ARNm para producir un ARNm maduro.

Antes de describir la presente invención de forma adicional, se debe comprender que la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que estas evidentemente pueden variar. También debe comprenderse que la

terminología utilizada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior y el inferior

5 de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, se abarca dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos menores pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos menores también abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

10 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también se puede usar en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se divultan y describen los métodos y/o materiales con relación a las publicaciones citadas.

15 Cabe señalar que tal como se usa en esta invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a «una dosis» incluye múltiples tales dosis y la referencia a «el polipéptido» incluye la referencia a una o más polipéptidos y equivalentes de estas conocidas por los expertos en la técnica, etc. Se señala además que

20 las reivindicaciones pueden ser redactadas de forma que excluyan cualquier elemento opcional. Como tal, esto pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva tal como "solamente", "únicamente" y similares con relación a la enumeración de los elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación "negativa".

25 Se aprecia que algunas características de la invención que, por razones de claridad, se describen en el contexto de modalidades separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Por otra parte,

varias características de la invención que, para ser breves, se describen en el contexto de una sola realización, también 30 se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las subcombinaciones de las realizaciones pertenecientes a la invención se encuentran específicamente comprendidas en la presente invención y se divultan en la presente como si cada una de dichas subcombinaciones estuviese divulgada de forma individual y específicamente en la presente. Además, todas las subcombinaciones de las diversas modalidades y elementos de estas también se encuentran específicamente comprendidas en la presente invención y se describen en la presente como si cada una de dichas subcombinaciones estuviese divulgada de forma individual y específicamente en el presente documento.

35 Las publicaciones discutidas en el presente documento se proporcionan únicamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo que aquí se incluye debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a dicha publicación en virtud de la invención anterior.

Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, lo que podría necesitar ser confirmado de manera independiente.

Descripción detallada

40 métodos para reducir uno o más niveles de triglicéridos, niveles de colesterol total y niveles de colesterol LDL en un sujeto. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen un polipéptido de la presente divulgación, para su uso y cuando el polipéptido se administra en una cantidad eficaz para reducir uno o más de los niveles de triglicéridos, niveles de colesterol total y niveles de colesterol LDL en un sujeto.

45 La presente divulgación proporciona el uso de polipéptidos que abarcan fragmentos de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido ANGPTL8 y homólogos de diferentes especies, y el uso de tales proteínas en la preparación de una formulación para terapia y en métodos para reducir los niveles de triglicéridos en un paciente. A continuación, se describen realizaciones ejemplares de los mismos. Los inventores han descubierto que aunque la administración de

50 ANGPTL8 de longitud completa da como resultado niveles elevados de triglicéridos, un fragmento de ANGPTL8 que carece de una región N-terminal de ANGPTL8 de longitud completa actúa como un negativo dominante al disminuir los niveles de triglicéridos. El fragmento contiene dominios enrollados en espiral presentes en el ANGPTL8 de longitud completa.

55 Los términos "betatrofina", "variante 1 de betatrofina", "variante 2 de betatrofina", "proteína 8 similar a la angiopoyetina", "Angptl8", "Angptl8", "lipasina" y "proteína asociada al carcinoma hepatocelular TD26" se usan indistintamente en el presente documento para describir la proteína ANGPTL8 (Uniprot ID: UNQ599/PR01185), productos de expresión del "gen ANGPTL8", también conocido como "C190rf80", "gen TD26 asociado al carcinoma hepatocelular", "TD26", "PR01185", "PVPA599" y "RIFL" (gen NCBI ID:55908). ANGPTL8 abarca variantes humanas y murinas que están codificadas por el gen ANGPTL8 o un gen homólogo al gen ANGPTL8.

La longitud completa de secuencia de aminoácidos de ANGPTL8 humano es:

MPVPALCLLWALAMVTRPASA APMGGPELAQHEELTLFHGTLQLGQA

LNGVYRTTEGRLTKARNSLGLYGRTIELLGQEVSGRDAAQELRASLLETQMEEDILQL

QAEATAEVLGEVAQAAQKVLRDSVQRLEVQLRSAWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILW

ALTGHVQRQRREMVAQQHRLRQIQLRHTAALPA (SEQ ID NO: 1; péptido señal predicho está subrayado). El locus genómico humano consenso que codifica ANGPTL8 se puede identificar como C19orf80 o NC_018930.2 (SEQ ID NO: 2) que genera un ARNm cuya secuencia es la siguiente: NM_018930.2|SEQ ID NO: 2

En relación con la secuencia de referencia de ANGPTL8 humana establecida en SEQ ID NO: 1, la proteína ANGPTL8 humana contiene un péptido señal de los residuos 1-21 y una cadena de ANGPTL8 de los residuos 22-198 que contiene dos dominios de espirales en espiral predichos de los residuos 76-140 y 165-194.

10 En algunas ocasiones, un polipéptido para usar en los métodos descritos en este documento puede ser un fragmento de ANGPTL8 que incluye una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de ANGPTL8 (SEQ ID NO.1), donde el polipéptido carece de un segmento N-terminal de ANGPTL8, donde el segmento N-terminal tiene al menos 70 aminoácidos de longitud.

En ciertos casos, la secuencia de aminoácidos contigua puede tener hasta 125 aminoácidos de longitud y puede tener al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de ANGPTL8 (SEQ ID NO. 1), y carecen de los primeros 70 aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO. 1. En otros casos, esta secuencia de aminoácidos contigua puede ser hasta 120, 119, 118, 115, 112, o 110 aminoácidos de largo y pueden tener al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de ANGPTL8 (SEQ ID NO. 1), y carecen de los primeros 70 aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO. 1.

20 1.

En algunos casos, un polipéptido para usar en los métodos descritos en el presente documento puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-70 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

25 En algunas realizaciones, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos 90%, 95%, 97%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-74 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1).

En algunas realizaciones, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o identidad de secuencia del 100% con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-75, 21-76, 21-77, 21-78, 21-79, 21-80 o 21-85 de ANGPTL8 de longitud completa de SEQ ID NO: 1 y donde la secuencia de aminoácidos contigua es 118-121, 119-121, 120-121, 121, 117-118, 117-119, 117-120, 118-125, 118-130, 119-135 o 119-140 aminoácidos de longitud, como 140, 130, 120, 122, 121, 117, 119 o 110 aminoácidos de longitud.

35 En ciertos casos, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos contigua que sea al menos en un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 76-140 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

En ciertos casos, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos contigua que sea al menos en un 85%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 76-140 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

En ciertos casos, el polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos contigua que incluye una primera secuencia de aminoácidos contigua operativamente unida a una segunda secuencia de aminoácidos contigua, donde la primera secuencia de aminoácidos contigua tiene al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 76-140 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1) y la segunda secuencia de aminoácidos contigua tiene al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 165-194 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1). En ciertos casos, la primera y la segunda secuencias de aminoácidos contiguas se pueden unir mediante una secuencia intermedia, tal como una secuencia enlazadora, p. ej., una secuencia enlazadora proporcionada en el presente documento.

50 En algunos casos, un polipéptido para usar en los métodos descritos en el presente documento puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia) a los residuos 80-198 de SEQ ID NO: 1 y, p. ej., puede estar representado por la secuencia de aminoácidos LGQEVSRGRDAAQKELRASLLETQMEEDILQLQAEATAEVLGEVAQAKVLRDSVQRLE

En algunos casos, un polipéptido para usar en los métodos descritos en el presente documento puede ser un anticuerpo monoclonal que reconoce y se une a una proteína diana con una afinidad de al menos del 95% de la actividad de la proteína diana.

ej., al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia) a:

MVPALCLLWALAMVTRPASAVSRGRDAAQELRASLLETQMEEIDLQL
 QAEATAEVLGEVAQAQKVLRDSVQRLEVQLRSAWLGPAYREFEVLKAHADKQSHILW
 5 ALTGHVQRQRREMVAQQHRLRQIQLHTAALPA (SEQ ID NO: 16)

En ciertas ocasiones de la presente divulgación, un ANGPTL8 de la presente divulgación puede ser un ANGPTL8 derivado de ANGPTL8 de ratón. La secuencia de proteína consenso de ANGPTL8 de ratón (Gm6484, NCBI RefSeq NP_001074409.1) es:

MAVLALCLLWTLASAVRPAPVAPLGGPEPAQYEELTLFHGALQLGQAL
 10 NGVYRATEARLTEAGHSLGLYDRALEFLGTEVRQGQDATQELRTSLSEIQVEEDALHL
 RAEATARSLGEVARAQALRDTVRRLQVLRGAWLQAHQEFTLKARADKQSHLL
 WALTGHVQRQQREMAEQQQWLRQIQQRLHTAALPA (SEQ ID NO: 6; el péptido señal está subrayado). El ANGPTL8 de ratón contiene un péptido señal de los residuos 1-15 de SEQ ID NO: 6 y una cadena ANGPTL8 de los residuos 16-198 de SEQ ID NO: 6. En algunas ocasiones, un péptido ANGPTL8 de interés puede contener todo o una parte del dominio de espiral en espiral C-terminal de los residuos 77-198 de ANGPTL8 de ratón de SEQ ID NO: 6 y, p. ej., puede estar representado por la secuencia de aminoácidos
 15 LGTEVRQGQDATQELRTSLSEIQVEEDALHLRAEATARSLGEVARAQALRDTVRRLQ
 VQLRGAWLGQAHQEFTLKARADKQSHLLWALTGHVQRQQREMAEQQQWLRQIQQ
 RLHTAALPA (SEQ ID NO: 7).

En algunas ocasiones, un ANGPTL8 de la presente divulgación puede estar representado por una o más variantes naturales, p. ej., en comparación con la secuencia de proteína de referencia descrita anteriormente o las secuencias de ADN de referencia proporcionadas anteriormente. Tales variantes naturales variarán y pueden incluir, pero no se limitan a, una sustitución W por R en la posición 59 de SEQ ID NO: 1 y una sustitución Q por R en la posición 147 de SEQ ID NO: 1.

Las variantes de un ANGPTL8 de la presente divulgación pueden, en algunos casos, estar representadas por secuencias de proteínas que tienen una o más delecciones de aminoácidos de longitud variable, incluidas delecciones que van desde 1-180 aminoácidos de longitud en comparación con el ANGPTL8 secuencia de proteínas establecida en SEQ ID NO:1, que incluyen pero no se limitan a,, eliminaciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, o 180 aminoácidos de longitud. En algunos casos, una variante de ANGPTL8 puede contener una delección de aminoácidos de 59 aminoácidos de longitud de los residuos 21-79 de la secuencia de la proteína ANGPTL8 de SEQ ID NO: 1.

Las delecciones de aminoácidos de las variantes de ANGPTL8 en cuestión no se limitan a aminoácidos internos o secuencias internas de aminoácidos y, en algunos casos, pueden estar representadas por truncamientos N-terminales o C-terminales. Por ejemplo, una variante de ANGPTL8 de la presente divulgación puede tener un truncamiento N-terminal o un truncamiento C-terminal que varía entre 1-180 aminoácidos de longitud, incluidos, entre otros, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, o 180 aminoácidos de longitud. En ciertas ocasiones, una variante de ANGPTL8 de la divulgación objeto puede representar una delección N-terminal de los aminoácidos 1-79 de ANGPTL8 de SEQ ID NO: 1.

En ciertas ocasiones de la presente divulgación, un péptido de interés en la presente divulgación se puede derivar de un gen relacionado con ANGPTL8 o contener una parte de una proteína relacionada con ANGPTL8. En ciertas ocasiones, un péptido de la presente divulgación se puede derivar de una o más proteínas de la familia de la angiopoyetina (ANG), p. ej., que incluyen pero no se limitan a angiopoyetina-1 (ANG-1, GenBank: AAM92271.1), angiopoyetina-2 (ANG-2, GenBank: AAI43903.1), angiopoyetina-3 (ANG-3, GenBank: AAD31728.1), angiopoyetina-4 (ANG-4, GenBank: AAI11977.1), proteína 1 similar a la angiopoyetina (ANGPTL1; GenBank : AAH50640.1), proteína 2 similar a angiopoyetina (ANGPTL2; GenBank: AIC50961.1), proteína 3 similar a angiopoyetina (ANGPTL3; GenBank: AAH07059.1), proteína 4 similar a angiopoyetina (ANGPTL4; GenBank: AIC56388.1), proteína 5 similar a

angiopoyetina (ANGPTL5; GenBank: AAQ89186.1), proteína 6 similar a angiopoyetina (ANGPTL6; GenBank: AAI42633.1) y proteína 7 similar a angiopoyetina (ANGPTL7; GenBank: AIC50550.1). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un polipéptido de casos de la presente divulgación puede derivar de o contener una parte de un polipéptido 2 similar a la angiopoyetina humana (AAH12368.1) de la secuencia de aminoácidos:

MRPLCVTCWWLGLLAAMGAVAGQEDGFEGTEEGSPREFIYLNRYKRA
 ESQDKCTYTFIVPQQRVTGAICVNSKEPEVLLENRVHKQELELLNNELLKQKRQIETLQ
 QLVEVDGGIVSEVKLLRKESRNMSRVTQLYMQLLHEIIRKRDNALELSQLENRILNQT
 ADMLQLASKYKDLEHKYQHLATLAHNQSEIIAQLEEHCQRVPSARPVPQPPPAPP
 YQPPTYNRIINQISTNEIQSDQNLKVLPPLPTMPTLTSPLSSTDKPSGPWRDCLQALEDG
 HDTSSIYLVKPENTNRLMQVWCDQRHDPGGWTVIQRRLDGSVNFFRNWETYKQGFGN
 IDGEYWLGLENIYWLTNQGNYKLLVTMEDWSGRKVFAEYASFRLEPESEYYKLRLGR
 YHGNAGDSFTWHNGKQFTTLDRDHDVYTGNCAHYQKGGWWYNACAHSNLNGVWY
 RGGHYRSRYQDGVYWAEFRGGSYSLKKVVMMIRPNPNTFH (SEQ ID NO: 8).

En algunas ocasiones, los péptidos de la presente divulgación que contienen un péptido de una proteína relacionada con ANGPTL8 pueden contener solo una parte o un dominio particular o una parte de un dominio particular de la proteína relacionada con ANGPTL8. Por ejemplo, en un caso, un péptido de interés puede contener una parte de un polipéptido 2 similar a la angiopoyetina humana, p. ej., representado por la secuencia de aminoácidos

LENRVHKQELELLNNELLKQKRQIETLQQLVEVDGGIVSEVKLLRKESRNMSRVTQL
 YMQLLHEIIRKRDNALELSQLENRILNQTADMLQLASKYKDLEHKYQHLATLAHNQSE
 IIA (SEQ ID NO: 9).

Secuencias de ácidos nucleicos y proteínas

El polipéptido sujeto se puede generar usando técnicas recombinantes para manipular ácidos nucleicos de diferentes ANGPTL8 conocidos en la técnica para proporcionar construcciones que codifiquen una proteína de interés.

Se apreciará que, con una secuencia de aminoácidos, el experto en la materia reconocerá inmediatamente una variedad de ácidos nucleicos diferentes que codifican dicha secuencia de aminoácidos en vista del conocimiento del código genético.

En algunas ocasiones, un ANGPTL8 de la presente divulgación se puede expresar a partir de un fragmento del ADNc recombinante que tiene la secuencia:

ATGCCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCCTGGCAATGGTGACC
 CGGCCTGCCTCAGCGGCCCATGGCGGCCAGAACTGGCACAGCATGAGGAGCT
 GACCTGCTCTTCCATGGGACCCCTGCAGCTGGGCCAGGCCCTAACGGTGTACA
 GGACCACGGAGGGACGGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCCTGGGTCTATGGCG
 CACAATAGAACTCCTGGGCAGGAGGTCAAGCCGGGGATGCAGCCCAGGAA
 CTTCGGGCAAGCCTGGAGACTCAGATGGAGGAGGATATTCTGCAGCTGCAGGC
 AGAGGCCACAGCTGAGGTGCTGGGGAGGTGGCCAGGCACAGAAGGTGCTACGG
 GACAGCGTGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGCCCTGCCTA
 CCGAGAATTGAGGTCTAAAGGCTCACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCTATGGG
 CCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGAGAGGTGGCACAGCAGCATCG
 GCTGCGACAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGCGCTCCCAGCCTGA (SEQ ID NO:4)

o variantes de la misma, que incluyen pero no se limitan a, variantes que tienen una o más mutaciones silenciosas de la secuencia ADNc anterior, que incluye, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190 y 190-200 mutaciones silenciosas.

El experto en la materia reconocerá fácilmente que las características de la proteína y el gen descritas en el presente documento con referencia a ANGPTL8 humano se pueden localizar de forma independiente o la presencia o ausencia de tales características en un gen o proteína relacionado determinado por la alineación de aminoácidos o nucleótidos de la secuencia relacionada. a la secuencia de referencia humana apropiada. Ejemplos de secuencias de genes homólogos relacionados con ANGPTL8 humano incluyen, pero no se limitan a C19H19orf80 de *P. troglodytes*, C20H19orf80 de *C. lupus*, C7H19orf80 de *B. taurus*, Gm6484 de *M. musculus* LOC100361444 de *R. norvegicus*. Las secuencias de proteínas homólogas relacionadas ejemplares con ANGPTL8 humano incluyen, pero no se limitan a XP_003316163.1, XP_005632923.1, XP_005208869.1, NP_001074409.1 y NP_001258639.1.

Otros genes parálogos relacionados con ANGPTL8 humano incluyen pero no se limitan a clg8h19orf80 de *Poecilia reticulata*, c2h19orf80 de *Anolis carolinensis*, C6H19orf80 de *Chlorocebus sabaeus*, C3H19orf80 de *Monodelphis domestica*, CA2H19orf80 de *Felis catus*, C7H19orf80 de *Capra hircus*, C7H19orf80 de *Equus caballus*, C19H19orf80 de *Macaca fascicularis*, C5H19orf80 de *Microtus ochrogaster*, C19H19orf80 de *Gorilla gorilla*, C19H19orf80 de *Papio anubis*, LOC102508050 de *Camelus ferus*, C22H19orf80 de *Callithrix jacchus*, LOC103783638 de *Pan paniscus*, LOC103734570 de *Nannospalax galili*, LOCI03678678 de *Ursus maritimus*, LOCI03591351 de *Galeopterus variegatus*, LOC103543218 de *Equus przewalskii*, LOC103301110 de *Eptesicus fuscus*, LOC103249447 of *Tarsius syrichta*, LOCI 03207899 de *Orycterus afer afer*, LOC 103170718 de *Ornithorhynchus anatinus*, LOC103162524 de *Cricetulus griseus*, LOC103007216 de *Balaenoptera acutorostrata scammoni*, LOC102983429 de *Physeter catodon*, LOC102964797 de *Panthera tigris altaica*, LOC102906929 de *Peromyscus maniculatus bairdii*, LOC102888052 de *Pteropus alecto*, LOC102862909 de *Elephantulus edwardii*, LOC102759590 de *Myotis davidii*, LOC102747799 de *Leptonychotes weddelli*, LOC102483995 de *Tupaia chinensis*, LOC102440177 de *Myotis lucifugus*, LOC102416148 de *Bubalus bubalis*, LOC102335494 de *Pantholops hodgsonii*, LOC102267376 de *Bos mutus*, LOC102244580 de *Myotis brandtii*, LOC102016286 def *Chinchilla lanigera*, LOC101972143 de *Ictidomys tridecemlineatus*, LOC101826982 de *Mesocricetus auratus*, LOC101706461 de *Heterocephalus glaber*, LOC101670309 de *Mustela putorius furo*, LOC101660529 de *Echinops telfairi*, LOC101599511 de *Jaculus jaculus*, LOC101568418 de *Octodon degus*, LOC101392854 de *Ceratotherium simum simum*, LOC101362133 de *Odobenus rosmarus divergens*, LOC101350564 de *Trichechus manatus latirostris*, LOC101336653 de *Tursiops truncatus* y LOC101284684 de *Orcinus orca*.

Modificaciones de proteínas

Las proteínas utilizadas en la presente divulgación se pueden proporcionar como proteínas que se modifican. Los propósitos de las modificaciones pueden ser aumentar una propiedad deseable en una proteína formulada para terapia (p. ej., vida media en suero), generar anticuerpos para su uso en ensayos de detección, y/o para purificación de proteínas, y similares.

Una forma de modificar una proteína objeto es conjugar (p. ej., unir) uno o más elementos adicionales en el N- y/o C-terminal de la proteína, tal como otra proteína (p. ej., que tiene una secuencia de aminoácidos heteróloga a la proteína objeto) y/o una molécula portadora. Por tanto, se puede proporcionar una proteína ejemplar como una proteína de fusión con un polipéptido o polipéptidos derivados de un polipéptido Fc de immunoglobulina.

Las modificaciones del conjugado a las proteínas pueden resultar en una proteína que retiene la actividad deseada, mientras que aprovecha las propiedades de la segunda molécula del conjugado para impartir y/o mejorar ciertas propiedades (p. ej., deseable para usos terapéuticos). Por ejemplo, el polipéptido se puede conjugar con una molécula, p. ej., para facilitar la solubilidad, el almacenamiento, la vida media, la reducción de la inmunogenicidad, la liberación controlada en tejido u otra ubicación corporal (p. ej., sangre u otros órganos particulares, etc.).

Otras características de una proteína conjugada pueden incluir una en donde el conjugado reduce la toxicidad en relación con una proteína no conjugada. Otra característica es que el conjugado se puede dirigir a un tipo de célula u órgano de manera más eficiente que a un material no conjugado. La proteína puede, opcionalmente, haber unido un fármaco para contrarrestar aún más las causas o efectos asociados con los trastornos del metabolismo (p. ej., fármaco para disminuir el nivel de triglicéridos), y/o se puede modificar opcionalmente para proporcionar un perfil farmacocinético mejorado (p. ej., mediante PEGilación, hiperglicosilación, y similares).

En ciertos casos, las secuencias de polipéptidos divulgadas en el presente documento se pueden conjugar con un polipéptido heterólogo que aumenta la vida útil in vivo (p. ej., la mitad del suero), y/o solubilidad (p. ej., disminuir la formación de agregados cuando se expresa a partir de una línea celular huésped o disminuir la agregación durante la purificación de una línea celular huésped).

Cualquiera de los componentes y moléculas anteriores utilizados para modificar las secuencias de polipéptidos de la presente divulgación se puede conjugar opcionalmente a través de un enlazador.

Los enlazadores adecuados incluyen "enlazadores flexibles" que generalmente tienen una longitud suficiente para permitir cierto movimiento entre las secuencias de polipéptidos modificados y los componentes y moléculas unidos. Las moléculas enlazadoras pueden tener una longitud de aproximadamente 6-50 átomos. Las moléculas enlazadoras también pueden ser, por ejemplo, acetileno de arilo, oligómeros de etilenglicol que contienen 2-10 unidades de monómeros, diaminas, diácidos, aminoácidos o combinaciones de estos. Los enlazadores adecuados se pueden

seleccionar fácilmente y pueden tener cualquier longitud adecuada, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 aminoácidos.

Los enlazadores flexibles ejemplares incluyen polímeros de glicina (G_n), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, polímeros de glicina-serina (por ejemplo, $(G_mS_o)_n$, $(GS\bar{G}GS)_n$ (SEQ ID NO: 18), $(G_mS_oG_m)_n$, $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ (SEQ ID NO: 19), $(GS\bar{G}GS_m)_n$ (SEQ ID NO: 20), $(GS\bar{G}S_mG)_n$ (SEQ ID NO: 21) y $(GGGS_m)_n$ (SEQ ID NO: 22), y combinaciones de estos, donde m, n y o se seleccionan independientemente de un entero de al menos 1 a 20, p. ej., 1-18, 2-16, 3-14, 4-12, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10), y otros enlazadores flexibles. Polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como una conexión neutra entre los componentes. Enlazadores flexibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a GGSG (SEQ ID NO: 23), GGSGG (SEQ ID NO: 24), GSGSG (SEQ ID NO: 25), GS\bar{G}GG (SEQ ID NO: 26), GS\bar{G}SG (SEQ ID NO: 27), y GS\bar{G}SGG (SEQ ID NO: 28).

Los enlazadores flexibles incluyen polímeros de glicina (G_n) o polímeros glicina-serina (por ejemplo, $(GS)_n$, $(GS\bar{G}GS)_n$ (SEQ ID NO: 18), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 29) y $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 32), donde n=1 a 50, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50). Enlazadores flexibles ejemplares incluyen, pero no se limitan a GGGS (SEQ ID NO: 31), GGGGS (SEQ ID NO: 32), GGSG (SEQ ID NO: 23), GS\bar{G}GGG (SEQ ID NO: 24), GSGSG (SEQ ID NO: 25), GS\bar{G}GGG (SEQ ID NO: 26), GS\bar{G}SG (SEQ ID NO: 27), y GS\bar{G}SGG (SEQ ID NO: 28). Un multímero (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30 o 30-50) de estas secuencias enlazadoras puede estar unido entre sí para proporcionar enlazadores flexibles que puedan ser usados para conjugar una secuencia de aminoácidos heteróloga a los polipéptidos descritos en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, la secuencia de aminoácidos heteróloga puede ser una secuencia de señalización y/o un socio de fusión, tal como albúmina, secuencia de Fc, y similares.

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

Se puede producir un polipéptido de la presente divulgación por cualquier procedimiento adecuado, que incluye procedimientos recombinantes y no recombinantes (p. ej., síntesis química). Cuando se sintetiza químicamente un polipéptido, la síntesis se puede llevar a cabo en fase líquida o una fase sólida. La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) permite la incorporación de modificaciones en la estructura principal de aminoácidos y/o péptidos/proteínas no naturales. Diversas formas de SPPS, tales como Fmoc y Boc, están disponibles para sintetizar polipéptidos de la presente divulgación. Los detalles de la síntesis química son conocidos en la técnica (p. ej., Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6:3-10 y Camarero JA et al. 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8). Brevemente, pequeñas perlas porosas insolubles se tratan con unidades funcionales sobre las que se construyen cadenas de péptidos. Despues de repetidos ciclos de acoplamiento/desprotección, la amina N-terminal libre de un péptido unido en fase sólida se acopla a una única unidad de aminoácidos N protegida. Esta unidad luego se desprotege, revelando una nueva amina N-terminal a la que se puede unir un aminoácido adicional. El péptido permanece inmovilizado en la fase sólida y se somete a un proceso de filtración antes de escindirse.

Cuando se produce la proteína mediante el uso de técnicas recombinantes, el polipéptido se puede producir como una proteína intracelular o como una proteína secretada, usando cualquier construcción adecuada y cualquier célula huésped adecuada, que puede ser una célula procariota o eucariota, tal como una bacteria (p. ej., *E. coli*) o una célula huésped de levadura, respectivamente.

Otros ejemplos de células eucariotas que se pueden utilizar como células huésped incluyen células de insectos, células de mamíferos y/o células vegetales.

Cuando se utilizan células huésped de mamífero que pueden incluir células humanas (p. ej., células HeLa, 293, H9 y Jurkat), células de ratones (por ejemplo, NIH3T3, células L y células C127), células de primates (p. ej., Cos 1, Cos 7 y CV1) y células de hámster (p. ej., células de ovario de hámster chino (CHO)).

En ciertos casos, las proteínas en cuestión, cuando se expresan en una célula, pueden incluir una secuencia señal que se puede escindir cuando la proteína se secreta fuera de la célula.

Una variedad de sistemas de vector huésped adecuados para la expresión de un polipéptido se pueden emplear según procedimientos estándar conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, Nueva York; y Ausubel y col. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, eds. Wiley and Sons.

Los procedimientos para la introducción de material genético dentro de las células huésped incluyen, por ejemplo, los procedimientos de transformación, electroporación, conjugación, fosfato de calcio y similares.

El método de transferencia se puede seleccionar de forma tal que proporcione una expresión estable del ácido nucleico que codifica la ANGPTL8 introducida. El ácido nucleico codificante de polipéptido se puede proporcionar como un elemento episomal hereditario (p. ej., un plásmido) o integrarse de forma genómica. Se encuentran disponibles comercialmente diversos vectores adecuados para usar en la producción de un polipéptido de interés.

Los vectores pueden proporcionar mantenimiento extracromosómico en una célula huésped o pueden proporcionar integración en el genoma de la célula huésped. El vector de expresión proporciona secuencias de regulación de la transcripción y la traducción y pueden proporcionar una expresión inducible o constitutiva, donde la región codificante se encuentra operativamente unida y su transcripción está bajo el control de la región de inicio de la transcripción y una región de terminación de transcripción y la traducción. En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y detención transcripcionales, secuencias de inicio y detención traduccionales y secuencias potenciadoras o de activación. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles y pueden ser un promotor constitutivo fuerte (p. ej., T7, CMV, y similares). En ciertos casos, las proteínas de la presente divulgación se pueden expresar a partir de una construcción de ácido nucleico en el que un promotor heterólogo está operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína.

Las construcciones de expresión generalmente tienen sitios de restricción convenientes ubicados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de interés. Un marcador que se selecciona operativo en el huésped de expresión puede estar presente para facilitar la selección de células que contienen el vector. Además, las construcciones de expresión pueden incluir elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener uno o dos sistemas de replicación, que le permiten, de esta manera, mantenerse en organismos, por ejemplo, en células de mamífero o insecto para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y amplificación. Además, la construcción de expresión puede contener un gen marcador que se selecciona para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes que se seleccionan son ampliamente conocidos en la técnica y variarán dependiendo de la célula huésped utilizada.

El aislamiento y purificación de una proteína se puede lograr según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína se puede aislar a partir de un lisado de células modificadas genéticamente para expresar la proteína constitutivamente y/o tras la inducción, o a partir de una mezcla de reacción sintética, mediante purificación de inmunoadsorción, que generalmente implica poner en contacto la muestra con un anticuerpo antiproteína, lavar para retirar el material no unido específicamente y eluir la proteína unida específicamente. La proteína aislada puede ser purificada adicionalmente mediante diáfragma y otros procedimientos empleados normalmente en los procedimientos de purificación de proteínas. En un caso, la proteína se puede aislar usando procedimientos de cromatografía de quelato metálico. La proteína de la presente divulgación puede contener modificaciones para facilitar el aislamiento, como se discutió anteriormente.

Las proteínas sujetas se pueden preparar de forma sustancialmente pura o aislada (p. ej., libre de otros polipéptidos). La proteína puede estar presente en una composición que está enriquecida para el polipéptido en relación a otros componentes que puedan estar presentes (p. ej., otros polipéptidos u otros componentes de células huésped). La proteína purificada se puede proporcionar tal que la proteína esté presente en una composición que esté sustancialmente libre de otras proteínas expresadas, p. ej., menos de 90%, normalmente menos del 60% y más habitualmente menos del 50% de la composición está formada por otras proteínas expresadas.

COMPOSICIONES

La presente divulgación proporciona composiciones que comprenden una proteína objeto, que se puede administrar a un sujeto que necesite reducir uno o más de los niveles de triglicéridos, niveles de colesterol total y niveles de LDL. En ciertos casos, la composición puede incluir un polipéptido sujeto como se describe en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden estar en forma de composiciones adecuadas para la administración a un sujeto. En general, tales composiciones son "composiciones farmacéuticas" que comprenden uno o más polipéptidos y uno o más diluyentes, portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables. En ciertos casos, los polipéptidos están presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz. Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en los procedimientos de la presente divulgación; por lo tanto, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar ex vivo o in vivo a un sujeto para practicar los procedimientos y usos terapéuticos y profilácticos descritos en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden formular para que sean compatibles con el procedimiento o la vía de administración previstos; vías de administración ejemplares se exponen en el presente documento. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en combinación con otros agentes o compuestos terapéuticamente activos (p. ej., un agente supresor del apetito) con el fin de tratar o prevenir las enfermedades, trastornos y afecciones como se contemplan en la presente descripción.

Las composiciones farmacéuticas normalmente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos uno de los polipéptidos contemplados por la presente descripción y uno o más agentes de formulación farmacéutica y fisiológicamente aceptables. Los diluyentes, portadores o excipientes farmacéutica y fisiológicamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico y bisulfato sódico), conservantes (por ejemplo, alcohol benzílico, parabenos de metilo, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato), agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes de dispersión, disolventes, rellenos, agentes de carga, detergentes, tampones, vehículos, diluyentes y/o adyuvantes. Por ejemplo, un vehículo adecuado puede ser una solución salina fisiológica o

solución salina tamponada de citrato, complementada posiblemente con otros materiales comunes en las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral. Vehículos adicionales ejemplares son una solución salina neutra amortiguada o una solución salina mezclada con albúmina de suero. Aquellos expertos en la materia reconocerán rápidamente una variedad de tampones que se podrían utilizar en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación. Los tampones normalmente incluyen, pero no se limitan a, ácidos débiles farmacéuticamente aceptables, bases débiles o mezclas de los mismos. Como ejemplo, los componentes de tampones pueden ser materiales solubles en agua tales como ácido fosfórico, ácidos tartáricos, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico, y sales de los mismos. Los agentes tamponadores aceptables incluyen, por ejemplo, un amortiguador Tris, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), sal de sodio de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS).

Después de que se haya formulado una composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, polvo sólido, deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar, ya sea en una forma lista para ser utilizada, una forma liofilizada que requiere reconstitución antes de ser utilizada, una forma líquida que requiere dilución antes de ser utilizada u otra forma aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona en un recipiente de un solo uso (p. ej., un vial, ampolla, jeringa o autoinyector de un solo uso (similar a, p. ej., un EpiPen®)), mientras que en otras realizaciones se proporciona un recipiente multiuso (p. ej., un vial multiuso). Se puede utilizar cualquier aparato de administración de fármacos para administrar los polipéptidos, que incluyen implantes (p. ej., bombas implantables) y sistemas de catéters, ambos de los cuales son conocidos por el experto en la técnica. Las inyecciones de depósito que generalmente se administran de forma subcutánea o intramuscular, también se pueden utilizar para liberar los polipéptidos descritos en el presente documento durante un período de tiempo definido. Las inyecciones de depósito normalmente son a base de aceite o sólidos y generalmente comprenden al menos uno de los componentes de la formulación establecida en el presente documento. Un experto en la materia está familiarizado con las formulaciones y usos posibles de inyecciones de depósito.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular según la técnica conocida con agentes de suspensión y agentes humectantes o dispersantes adecuados mencionados en el presente documento. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, una solución en 1,3-butanodiol. Los diluyentes, disolventes y medio de dispersión aceptables que se pueden emplear incluyen agua, solución de Ringer, solución de cloruro de sodio isotónico, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS), etanol, poliol (p. ej., glicerol, propileneglicol y polietileneglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. Además, se emplean convencionalmente aceites no volátiles estériles como un disolvente o medio de suspensión. Con este propósito, se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido, inclusive mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables también se pueden utilizar ácidos grasos tales como el ácido oleico. La absorción prolongada de formulaciones inyectables particulares se puede lograr al incluir un agente de retraso de la absorción (p. ej., monoestearato de aluminio o gelatina).

Las composiciones farmacéuticas que contienen el principio activo (p. ej., polipéptidos de la presente divulgación) pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, pastillas, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes, soluciones, microesferas o elíxires.

Las composiciones farmacéuticas previstas para uso oral se pueden preparar según cualquier procedimiento conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes tales como, por ejemplo, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables. Los comprimidos, cápsulas y similares contienen el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio, agentes desintegrantes y de granulación, por ejemplo, almidón de maíz o ácido algínico, agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina, o acacia y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Los comprimidos, cápsulas y similares adecuados para la administración por vía oral se pueden no recubrir o recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y de ese modo proporcionar una acción sostenida. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. También se pueden recubrir mediante técnicas conocidas en la materia para formar comprimidos terapéuticos osmóticos para la liberación controlada. Los agentes adicionales incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o una sustancia polimérica tales como poliésteres, ácidos de poliamida, hidrogel, polivinil pirrolidona, polianhídridos, ácido poliglicólico, etileno-vinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina o copolímeros de láctido/glicólido, copolímeros de poliláctido/glicólido o copolímeros de etilenovinilacetato para controlar la administración de una composición administrada. Por ejemplo, el agente oral se puede atrapar en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, mediante el uso de microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa o microcápsulas de polí(metilmetacrolato), respectivamente, en un sistema de administración de fármacos coloidales. Los sistemas de

dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microperlas y sistemas a base de lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. Los procedimientos para preparar liposomas se describen en, por ejemplo, los documentos de patente de EE.UU. n.º 4,235,871, 4,501,728, y 4,837,028. Los procedimientos para la preparación de las formulaciones mencionadas anteriormente serán evidentes para los expertos en la materia.

Las formulaciones para uso oral se pueden presentar también como cápsulas de gelatina duras donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio, caolín o celulosa microcristalina, o como cápsulas de gelatina blandas donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

10 Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de estas.

Tales excipientes pueden ser agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmethylcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y agentes dispersantes o humectantes, por ejemplo un fosfátilo de origen natural (p. ej., lecitina), o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos (por ejemplo, polioxietilenestearato), o productos de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (p. ej., heptadecaetileno oxicetanol), o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol (p. ej., monoleato de polioxietileno sorbitol), o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol (p. ej., monooleato de polietileno sorbitán). Las suspensiones acuosas también pueden

20 contener uno o más conservantes.

Las suspensiones aceitosas se pueden formular mediante la suspensión del principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tales como parafina líquida.

25 Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes tales como los establecidos anteriormente, y agentes saborizantes, para proporcionar una preparación oral agradable al paladar.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes.

30 Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ejemplifican en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de arachis, un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma acacia o goma tragacanto; fosfátidos de origen natural, por ejemplo, semillas de soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos; anhídridos de hexitol, por ejemplo, monoleato de sorbitán; y productos de condensación de los ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán.

40 Las formulaciones también pueden incluir vehículos para proteger la composición contra la degradación o eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, liposomas, hidrogeles, profármacos y sistemas de administración microencapsulados. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo solos, o en combinación con una cera.

La presente descripción contempla la administración de los polipéptidos en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco.

45 Los supositorios se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas normales pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se disuelve en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao y polietilenglicoles.

50 Los polipéptidos contemplados por la presente divulgación pueden encontrarse en forma de cualquier otra composición farmacéutica adecuada (p. ej., pulverizadores para uso nasal o inhalación) actualmente conocidos o desarrollados en el futuro.

La concentración de un polipéptido o fragmento del mismo en una formulación puede variar ampliamente (p. ej., de menos que alrededor de 0,1%, normalmente a o al menos alrededor de 2% hasta tanto como 20% a 50% o más en peso) y normalmente se seleccionará basándose principalmente en volúmenes de fluido, viscosidades y factores basados en el sujeto según el modo de administración específico seleccionado.

En el presente documento se contempla el uso de la tecnología de administración en depósito de Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Emeryville, CA). La tecnología utiliza una membrana de nanotubos de titanio que produce velocidad de liberación de orden cero de macromoléculas, tales como terapéuticos de proteínas y péptidos.

5 La membrana biocompatible se aloja en un pequeño implante subcutáneo que proporciona la administración de macromoléculas terapéuticas a velocidad constante a largo plazo (por ejemplo, hasta un año). La tecnología actualmente está siendo evaluada para la administración de agonistas GLP-1 para el tratamiento de diabetes de tipo II. En ciertos casos, el o los polipéptidos divulgados en el presente documento pueden ser una formulación con una membrana. Por ejemplo, el politizado se puede impregnar en la membrana o rodear con la membrana. La membrana puede tener forma de disco, tubo o esfera. En ciertos casos, el tubo puede ser un nanotubo o la esfera puede ser una nanoesfera.

10 Una composición farmacéutica objeto puede incluir un polipéptido como se proporciona en el presente documento. Por ejemplo, la composición farmacéutica objeto puede incluir un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia) a la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-75 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1); y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Poblaciones de pacientes

15 La presente divulgación proporciona un método para reducir los niveles de triglicéridos en un sujeto que tiene niveles elevados de triglicéridos. La presente divulgación proporciona un método para reducir los niveles de colesterol total en un sujeto que tiene niveles elevados de colesterol total. Los métodos ejemplares incluyen reducir los niveles de colesterol LDL en un sujeto que tiene niveles altos de colesterol LDL.

20 Los niveles elevados de triglicéridos están asociados con afecciones tales como enfermedad cardiovascular, enfermedad cardíaca, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, diabetes, enfermedad renal crónica, hiperlipidemias, pancreatitis, quilomicronemia, xantomas eruptivos y dolor abdominal. La hipertrigliceridemia grave, en particular, se asocia con quilomicronemia y xantomas eruptivos, dolor abdominal, y/o pancreatitis. Los niveles altos de triglicéridos, en particular, están asociados con diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, ciertas hiperlipidemias primarias. Además, los niveles elevados de triglicéridos son un factor que agrava las afecciones que aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, incluida la obesidad, la hipertensión y el tabaquismo.

25 30 hiperlipoproteinemia asociada con niveles elevados de triglicéridos puede ser hiperlipoproteinemia secundaria. La hiperlipoproteinemia secundaria asociada con niveles elevados de triglicéridos se asocia con un factor agravante de varias afecciones, tales como la obesidad, la ingesta excesiva de alcohol y el uso de una variedad de fármacos, incluyendo los diuréticos tiazídicos, los anticonceptivos orales y otros estrógenos, y algunos fármacos bloqueantes beta-adrenérgicos. Además, la hiperlipoproteinemia secundaria asociada con niveles elevados de triglicéridos se asocia además con diabetes mellitus, hipotiroidismo, enfermedad renal (uremia, síndrome nefrótico, diálisis de mantenimiento y trasplante renal), enfermedad hepática, disproteinemias y otras enfermedades metabólicas y endocrinas.

35 Los niveles elevados de triglicéridos también están asociados con condiciones asociadas al estrés agudo. Los estados asociados al estrés agudo asociados con niveles elevados de triglicéridos incluyen, pero no se limitan a, quemaduras, traumatismos, infarto de miocardio y sepsis.

40 45 Los niveles elevados de triglicéridos pueden, en algunas ocasiones, ser el resultado de una o más afecciones familiares o genéticas, ya sea directa o indirectamente. En algunas ocasiones, tales afecciones familiares o genéticas no responden al tratamiento directo o indirecto de los niveles elevados de triglicéridos. La hipertrigliceridemia persistente, incluida la hipertrigliceridemia que persiste a pesar del tratamiento de la afección subyacente, puede estar asociada con una forma primaria de hiperlipoproteinemia o causada por ella, tal como la hipertrigliceridemia familiar. Otras condiciones familiares asociadas con niveles elevados de triglicéridos incluyen lipidemia combinada familiar y disbetaipoproteinemia familiar (hiperlipoproteinemia de tipo III).

50 Los niveles altos de colesterol (colesterol total y colesterol LDL) están fuertemente asociados con enfermedades cardiovasculares porque promueven el desarrollo de placas de ateroma en las arterias (aterosclerosis). Este proceso de la enfermedad puede provocar infarto de miocardio (ataque cardíaco), accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica.

Como tal, los pacientes con cualquiera de las afecciones enumeradas anteriormente se pueden tratar administrando los polipéptidos descritos en el presente documento.

55 Se entiende que las afecciones enumeradas en este documento son ejemplares y no pretenden limitar las afecciones que se pueden tratar usando las composiciones descritas en el presente documento. Como tal, los pacientes que tienen otras afecciones también se pueden tratar usando las composiciones proporcionadas en el presente documento.

MÉTODOS

- Los métodos objeto implican la administración de las proteínas objeto a un paciente que tiene niveles elevados de triglicéridos. Como se usa en el presente documento, "niveles elevados de triglicéridos" o "niveles altos de triglicéridos" se refieren a niveles de triglicéridos superiores a un nivel óptimo de triglicéridos en una muestra de fluido corporal de un ser humano. La Asociación Americana del Corazón (AHA) recomienda que un nivel de triglicéridos de 100 mg/dL o menor se considera óptimo. "Niveles elevados de triglicéridos" o "niveles altos de triglicéridos" se refieren a niveles de triglicéridos superiores a 100 mg/dL, p. ej., superiores a 150 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL, 300 mg/dL, 350 mg/dL, 400 mg/dL, 450 mg/dL, o 500 mg/dL, o más.
- Los métodos objeto implican administrar las proteínas descritas en este documento a un paciente que tiene niveles de triglicéridos superiores a 100mg/dL, p. ej., superiores a aproximadamente 150 mg/dL, 200 mg/dL, 250 mg/dL, 300 mg/dL, 350 mg/dL, 400 mg/dL, 450 mg/dL, 500 mg/dL o más en una muestra de fluido corporal del paciente.
- sujetos que tienen, se sospecha que tienen o están en riesgo de desarrollar niveles elevados de triglicéridos se les puede administrar un polipéptido como se describe en el presente documento para tratar al paciente. Sujetos que tienen antecedentes familiares de niveles elevados de triglicéridos o estilo de vida, tales como un estilo de vida sedentario y/o una dieta alta en triglicéridos, que puede conducir a niveles elevados de triglicéridos, se puede considerar como en riesgo de desarrollar niveles elevados de triglicéridos.
- La presente divulgación proporciona un método para reducir los niveles de colesterol total en un sujeto que tiene niveles elevados de colesterol total. Como se usa en el presente documento, "niveles elevados de colesterol total" o "niveles altos de colesterol total" se refieren a niveles de colesterol total que son más altos que los niveles normales de colesterol total de aproximadamente menos de 200 mg/dL. Los niveles elevados de colesterol total abarcan niveles superiores a 200 mg/dL, p. ej., 210 mg/dL, 220 mg/dL, 240 mg/dL, 250 mg/dL, o más.
- La presente divulgación proporciona un método para reducir los niveles de colesterol LDL en un sujeto que tiene niveles elevados de colesterol LDL. Como se usa en el presente documento, "niveles elevados de colesterol LDL" o "niveles altos de colesterol LDL" se refieren a niveles de LDL superiores a 70 mg/dL, p. ej., por encima de 100 mg/dL, 120 mg/dL, 130 mg/dL, 150 mg/dL, 160 mg/dL, 180 mg/dL, 190 mg/dL, o más.
- Los pacientes con cualquiera de las afecciones enumeradas anteriormente pueden tener colesterol total elevado y/o colesterol LDL. En ciertos casos, el presente método se puede usar para reducir el colesterol total y/o colesterol LDL en un paciente que tiene riesgo de enfermedad cardíaca o tiene una enfermedad cardíaca. Sujetos que tienen antecedentes familiares de colesterol total elevado y/o colesterol LDL o estilo de vida, tal como un estilo de vida sedentario y/o una dieta alta en colesterol, que puede conducir a un colesterol total elevado y/o niveles de colesterol LDL se pueden considerar en riesgo de desarrollar colesterol total elevado y/o niveles de colesterol LDL.
- Por "tratamiento" se entiende lograr al menos una mejora de los síntomas asociados con la afección que padece el hospedador, donde mejora se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, p. ej., síntoma, asociado a la afección que se está tratando.
- Como tal, el tratamiento incluye situaciones en las que la afección, o al menos los síntomas asociados con ella, se reducen o evitan. Por tanto, el tratamiento incluye: (i) prevenir, es decir, reducir el riesgo de desarrollo de síntomas clínicos, incluyendo hacer que los síntomas clínicos no se desarrolle, p. ej., prevenir la progresión de la enfermedad a un estado nocivo o no deseado de otro modo; (ii) inhibir, que es, detener el desarrollo o desarrollo adicional de síntomas clínicos, p. ej., mitigar o inhibir completamente una enfermedad activa.
- En los métodos de la presente divulgación, las composiciones de proteínas descritas en el presente documento se pueden administrar a un sujeto (p. ej., un paciente humano) para, por ejemplo, lograr y/o mantener un nivel de triglicéridos objetivo, p. ej., para reducir el nivel de triglicéridos en el torrente sanguíneo a un intervalo encontrado en un individuo sano. Los sujetos para tratamiento incluyen aquellos que tienen una afección como se describe en el presente documento.
- Los métodos objeto pueden lograr una reducción de al menos 5% o más en los niveles de triglicéridos de un sujeto al que se le administra un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-74 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, la administración del polipéptido sujeto puede reducir los niveles de triglicéridos del sujeto en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o más.
- niveles de triglicéridos se pueden medir usando cualquier ensayo estándar. Por ejemplo, los niveles de triglicéridos se pueden medir en muestras de saliva, orina, sangre, suero o plasma de un sujeto usando un ensayo enzimático, p. ej., usando una lipasa. Cualquiera de los kits disponibles comercialmente se puede usar para medir los niveles de triglicéridos en una muestra de fluido corporal de un paciente. En ciertos casos, la muestra de líquido corporal puede ser sangre, suero o plasma.
- Los métodos objeto pueden lograr una reducción de al menos 5% o más en los niveles de colesterol total y/o de colesterol LDL de un sujeto al que se le administra un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198

de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO.1), donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-74 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, la administración del polipéptido sujeto puede reducir los niveles de colesterol total y/o de colesterol LDL del sujeto en al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o más.

5 **Vías de administración**

La presente descripción contempla la administración de los polipéptidos descritos, y composiciones de los mismos, en cualquier manera apropiada.

10 Las vías de administración adecuadas incluyen la vía parenteral (p. ej., intramuscular, intravenosa, subcutánea (p. ej., inyección o implante), intraperitoneal, intracisternal, intraarticular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal) e intracerebroventricular), oral, nasal, vaginal, sublingual, intraocular, rectal, tópica (p. ej., transdérmica), sublingual e inhalación. En ciertos casos, la administración puede ser subcutánea.

15 Las inyecciones de depósito que generalmente se administran de forma subcutánea o intramuscular, también se pueden utilizar para liberar los polipéptidos descritos en el presente documento durante un período de tiempo definido.

20 Las inyecciones de depósito normalmente son a base de aceite o sólidos y generalmente comprenden al menos uno de los componentes de la formulación establecida en la presente invención. Un experto en la materia está familiarizado con las formulaciones y usos posibles de inyecciones de depósito.

25 La presente divulgación contempla métodos en donde los polipéptidos de la presente divulgación se administran a un sujeto al menos dos veces por día, al menos una vez por día, al menos una vez cada 48 horas, al menos una vez cada 72 horas, al menos una vez a la semana, al menos una vez cada 2 semanas, al menos una vez al mes, al menos una vez cada 2 meses, o al menos una vez cada 3 meses, o menos frecuentemente.

Terapia de combinación

Cualquiera de una amplia variedad de terapias dirigidas a tratar o prevenir niveles elevados de triglicéridos se puede combinar en una composición o método terapéutico con las proteínas objeto.

30 Ejemplos de agentes que se pueden proporcionar en una terapia de combinación incluyen estatinas, fibratos, niacina y aceite de pescado.

35 Cuando la proteína objeto se administra en combinación con una o más terapias, la terapia de combinación se puede administrar en cualquier lugar desde simultáneamente hasta 5 horas o más, por ejemplo, 10 horas, 15 horas, 20 horas o más, antes o después de la administración de una proteína objeto. En ciertos casos, una proteína objeto y otra intervención terapéutica se administran o aplican secuencialmente, p. ej., cuando una proteína objeto se administra antes o después de otro tratamiento terapéutico. En otros casos más, una proteína objeto y otra terapia se administran simultáneamente, p. ej., cuando una proteína objeto y una segunda terapia se administran al mismo tiempo, p. ej., cuando una segunda terapia es un fármaco se puede administrar junto con un anticuerpo o conjugado de anticuerpos sujeto como dos formulaciones separadas o combinadas en una composición individual que se administra al sujeto. Sin importar si se administran secuencial o simultáneamente, como se ilustra anteriormente, los tratamientos se consideran como administrados juntos o en combinación para los fines de la presente descripción.

Dosis

40 En los métodos descritos en el presente documento, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína objeto a un paciente que la necesita. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína objeto hace que los niveles de triglicéridos disminuyan al menos aproximadamente 5% en comparación con los niveles de triglicéridos determinados antes del tratamiento del paciente con el polipéptido objeto. En ciertos casos, la proteína objeto hace que los niveles de triglicéridos vuelvan a un nivel normal cuando la proteína objeto se administra al torrente sanguíneo en una cantidad eficaz a un paciente que no tenía niveles normales de triglicéridos antes del tratamiento.

45 En métodos ejemplares, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína objeto a un paciente que la necesita. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína objeto en cuestión provoca los niveles de colesterol total y/o niveles de colesterol LDL disminuirán al menos aproximadamente 5% en comparación con los niveles determinados antes del tratamiento del paciente con el polipéptido sujeto. En ciertos casos, la proteína objeto provoca el retorno de los niveles de colesterol total y/o niveles de colesterol LDL a niveles normales cuando la proteína objeto se administra al torrente sanguíneo en una cantidad eficaz a un paciente que no tenía niveles normales de colesterol total y/o niveles de colesterol LDL antes del tratamiento.

50 La cantidad administrada varía según el objetivo de la administración, la salud y la condición física del individuo a tratar, la edad, el grado de resolución deseado, la formulación de una proteína objeto, la actividad del sujeto proteínas empleadas, la evaluación del médico tratante de la situación médica, el estado del sujeto y el peso corporal del sujeto, así como la gravedad del estado y otros factores relevantes. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso.

Se espera que la cantidad esté incluida en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar mediante ensayos habituales.

Por ejemplo, la cantidad de proteína del sujeto empleada para disminuir uno o más de los triglicéridos, el colesterol total y el colesterol LDL no es más que aproximadamente la cantidad que de otro modo podría ser irreversiblemente tóxica para el sujeto (es decir, dosis máxima tolerada). En otros casos, la cantidad está alrededor o incluso muy por debajo del umbral tóxico, pero aún en un intervalo de concentración eficaz, o incluso tan bajo como la dosis umbral.

Las dosis individuales no suelen ser inferiores a la cantidad necesaria para producir un efecto que se puede medir en el sujeto y se pueden determinar en función de la farmacocinética y la farmacología de la absorción, distribución, metabolismo y excreción ("ADME") de la proteína objeto o sus subproductos y, por tanto, en base a la disposición de la composición dentro del sujeto. Esto incluye la consideración de la vía de administración, así como la cantidad de dosis, que se puede ajustar para aplicaciones enterales (se aplica a través del tracto digestivo para efectos sistémicos o locales cuando se retiene en parte del tracto digestivo) o parenterales (se aplica por vías distintas del tracto digestivo para efectos sistémicos o locales). Por ejemplo, la administración de una proteína objeto es normalmente mediante inyección y, a menudo, subcutánea, intravenosa, intramuscular o una combinación de las mismas.

Una dosis eficaz (ED) es la dosis o cantidad de un agente que produce una respuesta terapéutica o efecto deseado en alguna fracción de los sujetos que la toman. La "dosis eficaz media" o ED₅₀ de un agente es la dosis o cantidad de un agente que produce una respuesta terapéutica o efecto deseado en el 50% de la población a la que se administra. Aunque la ED₅₀ se usa comúnmente como una medida de expectativa razonable del efecto de un agente, no es necesariamente la dosis que un clínico pueda considerar apropiada teniendo en cuenta todos los factores relevantes.

En algunos casos, la cantidad eficaz es la misma que la ED₅₀ calculada y, en ciertos casos, la cantidad eficaz es una cantidad que es mayor que la ED₅₀ calculada. En ciertos casos, la cantidad eficaz es una cantidad menor que el ED₅₀ calculado.

Una cantidad eficaz de una proteína también puede ser una cantidad que sea eficaz, cuando se administra en una o más dosis, para disminuir los niveles de triglicéridos de un individuo en al menos aproximadamente 5%, al menos sobre 10%, al menos sobre 20%, al menos sobre 25%, al menos sobre 30%, al menos sobre 40%, al menos sobre 50%, al menos sobre 60%, al menos sobre 70%, al menos sobre 80%, o más de 80%, en comparación con los niveles de triglicéridos en el individuo antes del tratamiento.

Otros ejemplos de dosis por administración pueden ser menos de 10 µg, menos de 2 µg o menos de 1 µg. La dosis por administración también puede ser más de 50 µg, más de 100 µg, más de 300 µg hasta 600 µg o más. Un ejemplo de un intervalo de dosificación por peso es aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 1 µg/kg, hasta aproximadamente 1 mg/kg o más. Las cantidades eficaces y los regímenes de dosificación se pueden determinar fácilmente de forma empírica a partir de ensayos, de seguridad y escalamiento y ensayos de intervalo de dosis, así como ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica.

La expresión «forma de dosificación unitaria», tal como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de proteínas de la presente descripción en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitaria dependen de la proteína particular empleada y el efecto a lograr, y la farmacodinámica asociada con cada proteína en el huésped.

Kits

También se proporcionan en la presente divulgación kits para usar las composiciones divulgadas en este documento y para practicar los métodos, como se describe anteriormente. Los kits se pueden proporcionar para la administración de la proteína objeto en un sujeto que necesita tratamiento o prevención de uno o más niveles altos de triglicéridos, niveles altos de colesterol total y colesterol LDL alto. Un kit puede incluir uno o más de las proteínas descritas en el presente documento, que se puede proporcionar en una formulación adecuada con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuada para administrar a un sujeto. Las proteínas se pueden proporcionar con una formulación que está lista para usarse tal cual o se puede reconstituir para tener las concentraciones deseadas. Cuando las proteínas se proporcionan para ser reconstituidas por un usuario, el kit también puede incluir tampones, excipientes farmacéuticamente aceptables y similares, envasados por separado de la proteína objeto. Las proteínas del presente kit se pueden formular por separado o en combinación con otros fármacos.

Además de los componentes mencionados anteriormente, los kits pueden incluir además instrucciones para usar los componentes del kit para practicar los métodos objeto. Las instrucciones para practicar los métodos del tema se registran generalmente en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar impresas en un soporte, como papel o plástico, etc. Como tal, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del recipiente del kit o componentes del mismo (es decir, asociado con el empaquetado o subempaquetado), etc. En otros casos, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento adecuado legible por computadora, p. ej., CD-

ROM, disquete, etc. En otros casos más, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener las instrucciones de una fuente remota, p. ej., a través de Internet. Un ejemplo de este caso es un kit que incluye una dirección web donde se pueden ver las instrucciones y/o desde donde se pueden descargar las instrucciones. Al igual que con las instrucciones, los medios para obtener las instrucciones se registran en un sustrato adecuado.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a aquellos expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completas sobre cómo preparar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique lo contrario, las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se encuentra en grados Celsius y la presión es atmosférica o similar. Se pueden utilizar abreviaturas estándar, p. ej., bp, par o pares de bases; kb, kilobase/s; pl, picolitro/s; s o seg, segundo/s; min, minuto/s; h, hora/s; aa, aminoácido/s; kb, kilobase/s; bp, par o pares de bases; nt, nucleótido/s; i.m., intramuscular o por vía intramuscular; i.p., intraperitoneal o por vía intraperitoneal; s.c, subcutánea o por vía subcutánea y similares.

Materiales y procedimientos

Construcción de vectores AAV:

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó según las instrucciones del fabricante. Los kits de reactivos de PCR con ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® se adquirieron de New England BioLabs (F-530L, Ipswich, MA). Las reacciones se prepararon según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN amplificados que contenían hANGPTL8 de longitud completa y variantes de los mismos se digirieron con las enzimas de restricción XbaI y BamHI (o XbaI y BglII para ANGPTL8-V2) y luego se ligaron con vectores transgénicos de AAV que habían sido digeridos con las mismas enzimas de restricción. El vector usado para la expresión contenía un marcador que se selecciona y un casete de expresión compuesto por un fuerte promotor eucariota 5' de un sitio para la inserción de la secuencia codificante clonada, seguido de una región 3' no traducida y una cola de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino. La construcción de expresión también está flanqueada por repeticiones terminales internas en los extremos 5' y 3'.

Las secuencias del cebador de PCR fueron las siguientes:

30 ANGPTL8:

Directo: TACATATCTAGAATGCCAGTGCGCTGCTCTGTG (SEQ ID NO: 10)

Inverso: CGCGGATCCTCAGGCTGGGAGCGCCGC (SEQ ID NO: 11)

ANGPTL8-V1:

Directo: TACATATCTAGAATGCCAGTGCGCTGCTCTGTG (SEQ ID NO:12)

35 Inverso: CGCGGATCCTCACTCCTGCCAGGAGTTC (SEQ ID NO:13)

Modelo de ratón:

Ratones C57BL/6 macho de seis semanas (Research Diets, catalog # D12492NI) recibieron una inyección única en la vena de la cola de AAV recombinante (rAAV). El peso corporal del ratón y los niveles de triglicéridos en suero se determinaron en varios momentos.

40 Ensayo de triglicéridos en plasma:

plasma se recogió mediante un corte de cola. Los triglicéridos se midieron usando el kit M de triglicéridos de tipo L siguiendo las instrucciones del fabricante.

Prueba de tolerancia oral a los lípidos:

45 ratones fueron alimentados con 10 µL/g de aceite de maíz (aceite de maíz Mazola de ACH food companies, Inc., Memphis, TN). La sangre de la cola se recogió a los 0, 80, 145 minutos después del aceite de maíz. Los triglicéridos se midieron usando el kit M de triglicéridos de tipo L siguiendo las instrucciones del fabricante.

Prueba de secreción de VLDL:

ratones se les inyectaron 10 µL/g de Tyloxapol (Sigma, St. Louis, MO) para bloquear la actividad de LPL endógena. La sangre de la cola se recogió a 1h, 2h, y 4,5h después de la inyección. Los niveles de triglicéridos se midieron 50 usando el kit M de triglicéridos de tipo L (Wako Chemicals, Richmond, VA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1: Sobreexpresión de ANGPTL8 por AAV en ratones

Este ejemplo describe el efecto metabólico de ANGPTL8 en ratones tratados con un vector de virus adenoasociado (AAV) que sobreexpresa ANGPTL8 de longitud completa tanto de ratón como de ser humano. Se inyectaron AAV a través de la vena de la cola en ratones. Los niveles de triglicéridos en plasma se midieron semanalmente en la sangre

- 5 de la cola. Como se muestra en la FIG. 1, la sobreexpresión de ANGPTL8 aumentó significativamente los triglicéridos en plasma (los datos que se muestran son en la semana 4 después de la inyección, se observó la misma tendencia a lo largo del curso del estudio). La sobreexpresión de otro miembro de la familia relacionado, ANGPTL2, no afectó significativamente los niveles de triglicéridos en plasma.

Ejemplo 2: Sobreexpresión de ANGPTL8-V2 reducido en triglicéridos en plasma en ratones

- 10 Como se muestra en la FIG. 2A, se hicieron variantes de ANGPTL8 con delección del extremo N o del extremo C terminal. Los péptidos señal endogeos (SP) se conservaron con ambas construcciones. Se inyectaron AAV a través de la vena de la cola en ratones. La sobreexpresión de ANGPTL8 de longitud completa aumentó significativamente los niveles de triglicéridos en plasma (Figura 2B-C). Por el contrario, la sobreexpresión de ANGPTL8-V1 no afectó los niveles de triglicéridos en plasma, lo que sugiere que el extremo C-terminal es esencial para la acción de aumento de 15 triglicéridos. Inesperadamente, la sobreexpresión de ANGPTL8-V2 resultó en una marcada supresión de los triglicéridos en plasma. Esto muestra que ANGPTL8-V2 funciona como una forma negativa dominante.

Ejemplo 3: Mecanismo de efecto de ANGPTL8 y variantes sobre los triglicéridos en plasma

- 20 Como se muestra en la FIG. 3, se utilizó una prueba de tolerancia a los lípidos orales para evaluar cómo las variantes de ANGPTL8 impactan los niveles de triglicéridos en plasma. La sobreexpresión de ANGPTL8 de longitud completa afectó en gran medida el aclaramiento de los triglicéridos en plasma. Por el contrario, la sobreexpresión de ANGPTL8-V2 resultó en una mejora dramática de la tolerancia a los lípidos, lo que sugiere la aparición de una absorción de lípidos reducida y/o aclaramiento mejorado. También se evaluó el impacto potencial sobre la secreción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Los triglicéridos son secretados por el hígado como parte de VLDL. En esta prueba, se 25 inhibió la eliminación de triglicéridos endógenos aplicando un inhibidor de LPL, Tyloxapol. La sobreexpresión de ANGPTL8-V2 dio como resultado una acumulación marcadamente reducida de triglicéridos en plasma, lo que sugiere que ANGPTL8-V2 suprime la secreción de VLDL del hígado (Figura 4).

En estos estudios se utilizaron las siguientes secuencias:

hANGPTL8 de longitud completa:

```
MPVPALCLLWALAMVTRPASAAPMGGPELAQHEELTLLFHGTIQLQ
LGQALNGVYRTTEGRLTKARNSLGLYGRTELLGQEVSRRDAAQELRASLLETQMEE
DILQLQAEATAEVLGEVAQAKVLRDSVQRLEVQLRSAWLGPAYREFEVKAHADKQ
SHILWALTGHVQRQRREMVAQQHRLRQIQLERLHTAALPA (SEQ ID NO:1)
```

ADNc de hANGPTL8 de longitud completa:

```
ATGCCAGTCCTGCCTCTGTGCCTGCTCTGGCCCTGGCAATGGT
GACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCCATGGCGGCCAGAACTGGCACAGCATGAGG
AGCTGACCTGCTTCCATGGGACCTGCAGCTGGCCAGGCCCTAACGGTGTG
TACAGGACCACGGAGGGACGGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCCTGGTCTATG
GCCGCACAATAGAACTCCTGGGCAGGAGGTCAAGCCGGCCGGATGCAGCCC
GGAACCTCGGGCAAGCCTGTTGGAGACTCAGATGGAGGAGGATATTCTCAGCTGC
AGGCAGAGGCCACAGCTGAGGTGCTGGGGAGGTGGCCAGGCACAGAAAGGTGCT
ACGGGACACGCGTAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGCCCT
GCCTACCGAGAATTGAGGTCTAAAGGCTACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCT
ATGGGCCCTCACAGGCCACGTGCAGCGGAGAGCTCCACACAGCGCGCTCCCAGCCTGA
CATCGGCTGCGACAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGCGCTCCCAGCCTGA
(SEQ ID NO:4)
```

ANGPTL8-V1:

MPVPALCLLWALAMVTRPASAAPMGGPELAQHEELLLFHGTLQ
LGQALNGVYRTTEGRLLTKARNSLGLYGRTELLGQE (SEQ ID NO:14)

ANGPTL8-V1cDNA:

ATGCCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCCTGGCAATGGT
GACCCGGCCTGCCTCAGCGGCCCCATGGCGGCCAGAACTGGCACAGCATGAGG
AGCTGACCTGCTCTCCATGGGACCCCTGCAGCTGGGCCAGGCCCTAACGGTGTG
TACAGGACCACGGAGGGACGGCTGACAAAGGCCAGGAACAGCCTGGTCTATG
GCCGCACAATAGAACTCCTGGGCAGGAG (SEQ ID NO: 15)

5

ANGPTL8-V2:

MPVPALCLLWALAMVTRPASAVSRGRDAAQELRASLLETQMEE
DILQLQAEATAEVLGEVAQAQKVLRDSVQRLEVQLRSAWLGPAYREFEVLA
SHILWALTGHVQRQRREMVAQQHRLRQIQLERLHTAALPA (SEQ ID NO: 16)

ADNc de ANGPTL8-V2:

ATGCCAGTGCCTGCTCTGTGCCTGCTCTGGGCCCTGGCAATGGT
GACCCGGCCTGCCTCAGCGGTCAAGCCGGGCCGGATGCAGCCCAGGAACCTCGGG
CAAGCCTGTTGGAGACTCAGATGGAGGAGGATTCTGCAGCTGCAGGCAGAGGCC
ACAGCTGAGGTGCTGGGGAGGTGGCCAGGCACAGAAGGTGCTACGGACAGCG
TGCAGCGGCTAGAAGTCCAGCTGAGGAGCGCCTGGCTGGCCCTGCCTACCGAGAA
TTTGAGGTCTAAAGGCTACGCTGACAAGCAGAGCCACATCCTATGGGCCCTCAC
AGGCCACGTGCAGCGGAGAGGGAGATGGTGGCACAGCAGCATCGCTGCAG
CAGATCCAGGAGAGACTCCACACAGCGCGCTCCCAGCCTGA (SEQ ID NO: 17)

10 **Listado de secuencias**

<110> NGM BIOPHARMACEUTICALS INC. Liu, Zhonghao Ding, Xunshan
<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE CONDICIONES ASOCIADAS A
TRIGLICÉRIDOS ELEVADOS

15 <130> NGMB-137WO

<150> 62/059,682

<151> 03-10-2014

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 198

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 1

ES 2 819 866 T3

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

<210> 2

<211> 2325

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

5

ES 2 819 866 T3

atacccttaga ccctcagtca tgccagtgcc tgctctgtgc ctgctctggg ccctggcaat	60
ggtgacccgg cctgcctcag cggccccat gggcgccca gaactggcac agcatgagga	120
gctgaccctg ctcttccatg ggaccctgca gctgggccag gccctcaacg gtgtgtacag	180
gaccacggag ggacggctga caaaggccag gaacagcctg ggtctctatg gccgcacaat	240
agaactcctg gggcaggagg tcagccgggg cgccggatgca gcccgaggaac ttccgggcaag	300
cctgttggag actcaggtgg gcaccgtagc tgcgacactg tgggttggcc aggagtccaa	360
agaggagttc gtgtctaggg taacccaacca tcctggtttgc cccaggactg aaggaggattcc	420
tgggatacaa gattttcagc gataaactca ggcaagtccct taggtacaca aagatgagtt	480
ggacatccta ctagtacccc actgtttatt aagcagatgg aggaggatat tctgcagctg	540
caggcagagg ccacagctga ggtgctgggg gaggtggccc aggcacagaa ggtgctacgg	600
gacagcgtgc agcggctaga agtccagctg aggagcgcct ggctgggcc tgcctaccga	660
gaatttgagg tcttaaaggt aaggagctcc cccaaacccta gtgggctgag accctgattt	720
ccggccagaaa ctcgcttctg caccttgagt cccaaagacc tcccaagatca gcctcccaagc	780
tctgtggcat ctaccctgca tgtccccaga caaaaactcaa gtcctttgt gtgcctcagt	840
ttcccttttg tgtgcctcag ttgcaaataa gggcaacacc tgatatctca cagtagggcc	900
aggtaactcaa tgcaggtaaa atattcagca tggggcgggc acacagttgg tgctcaataa	960
attctttttt ttttttttt tgagacagag tctcactgtt gcccaggctg gagtgcagtg	1020
gtgtgatctt ggctcactgc aacctccacc tccttaggttc aagtgattct cctgcctcag	1080
cctcctgagt agctgaaatt acaggtgcac cagctaattt ttgtattttt tagtagagat	1140
gggatttcac catgttggcc aggctggctc cgaactcctg acctaaggg atctgcctgc	1200
ctcggtttcc caaagtgcgtg ggattacagg tgtgagccac tacacctggc caataaattc	1260
ttactactag agaaactggt aacatTTTGT gagcaccacca taagtaccca gcactgttct	1320

ES 2 819 866 T3

	atgcccctta ataatccata tcatggccgg gcatggtggc tcatgcctgt aatcccagca	1380
	ctttggtag ctaagggtgg tggaaacactt aaggtcagga gttcgagacc accctggcca	1440
	acatggtcaa accccgtctc tactaaaaat acaaaaaatt agctggcggt ggtggcacat	1500
	gcctgtagtc ccagctactc aggaggctta ggtaggagaa tcgcttgaac ctgggaggtg	1560
	gaggttgcag tgagctgaga tcgtgtcatt gcactcagcc tgggtgacag agagagactc	1620
	aaaaaaaaaaa aaaaatccat aggatgttca tcacctcccc atgaagttag tcctatttt	1680
	tccccatttt acagatgggg aaactgaggc caaagagcat tggacttg ctgggtcaca	1740
	cagatacaat gaggggctgg ggcagagggt caggggatgg gaggtgaggt ggctgtcggc	1800
	tgagggtttcc attctgaccc ccacaggctc acgctgacaa gcagagccac atcctatggg	1860
	ccctcacagg ccacgtgcag cggcagaggc gggagatggt ggcacagcag catggctgc	1920
	gacagatcca ggagaggtga gcctggcagg gtttggcag gcagggcagt tggatggggg	1980
	gcccacacagg cagctggaaa gggccccct cacctggct gagccacatc tccctcccc	2040
	gactccacac agcggcgctc ccagcctgaa tctgcctgga tggaaacttag gaccaatcat	2100
	gctgcaagga acacttccac gccccgtgag gcccctgtgc agggaggagc tgcctgttca	2160
	ctgggatcaag ccagggcgcc gggccccact tctgagcaca gagcagagac agacgcaggc	2220
	ggggacaaag gcagaggatg tagccccatt ggggagggggt ggaggaagga catgtaccct	2280
	ttcatgccta cacacccctc attaaagcag agtcgtggca tctca	2325
5	<210> 3	
	<211> 755	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 3	
	aaccagaccc cagcagccag gcccggggcc gcccggcccg gcaagggacc cggccggccca	60
	gcggccccca gggcgccccca gaacggcaca gcagaggagc gacccggcccc agggacccgc	120
	agcggggccag gccccaacgg ggacaggacc acggaggac ggcgacaaag gccaggaaca	180
	gccggggccag gccgcacaaa gaaccgggg caggaggcag cggggccgg gagcagccca	240
	ggaaccgggc aagccgggag accagaggag gaggaacgca ggcgaggcag aggccacagc	300
	gagggcggggg gaggggccccca ggcacagaag ggcacgggac agcggcagcg gcagaagcca	360
	gcgaggagcg cggcgccggcc cgccaccccgag aagaggcaaa ggccacgcga caagcagagc	420
	cacaccaggc ccccacaggc cacggcagcg gcagaggcgg gagagggcga cagcagcagc	480
	gcgcgacaga ccaggagaga cccacacagc ggcgccccag ccgaacgcgg gaggaacgag	540
	gaccaacagc gcaaggaaca cccacgcccc ggaggccccg gcagggagga gcgcggcaccg	600
	ggacagccag ggccgcggggc cccacccgagc acagagcaga gacagacgca ggcggggaca	660
	aaggcagagg agagccccag gggagggggg aggaaggaca gaccccagcc acacacccccc	720
	aaaagcagag cgggcaccaa aaaaaaaaaa aaaaa	755
10	<210> 4	
	<211> 597	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

<223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

ES 2 819 866 T3

<400> 4
atgccagtgc ctgctctgtg cctgctctgg gccctggcaa tggtgaccccg gcctgcctca 60
gcggccccca tgggcggccc agaactggca cagcatgagg agctgaccct gctcttccat 120
gggaccctgc agctgggcca ggccctcaac ggtgtgtaca ggaccacgga gggacggctg 180
acaaaggcca ggaacagcct gggtctctat ggccgcacaa tagaactcct gggcaggag 240
gtcagccggg gccgggatgc agcccaggaa ctccggcaa gcctgttga gactcagatg 300
gaggaggata ttctgcagct gcagggcagag gccacagctg aggtgctggg ggaggtggcc 360
caggcacaga aggtgctacg ggacagcgtg cagcggctag aagtccagct gaggagcgc 420
tggctggcc ctgcctaccg agaattttagt gtcttaaagg ctcacgctga caagcagagc 480
cacatccat gggccctcac aggccacgtg cagcggcaga ggccggagat ggtggcacag 540
cagcatcggc tgccgacagat ccaggagaga ctccacacag cggcgctccc agcctga 597

5 <210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 5
Leu Gly Gln Glu Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu Arg
1 5 10 15

Ala Ser Leu Leu Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu Gln
20 25 30

Ala Glu Ala Thr Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln Lys
35 40 45

Val Leu Arg Asp Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser Ala
50 55 60

Trp Leu Gly Pro Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His Ala
65 70 75 80

Asp Lys Gln Ser His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg
85 90 95

Gln Arg Arg Glu Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile Gln
100 105 110

<210> 6

<211> 198

< 212> PRT

< 213> Mus

<400> 6

<400> 6

ES 2 819 866 T3

Met Ala Val Leu Ala Leu Cys Leu Leu Trp Thr Leu Ala Ser Ala Val
1 5 10 15

Arg Pro Ala Pro Val Ala Pro Leu Gly Gly Pro Glu Pro Ala Gln Tyr
20 25 30

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

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

His Ser Leu Gly Leu Tyr Asp Arg Ala Leu Glu Phe Leu Gly Thr Glu
65 70 75 80

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

Glu Ile Gln Val Glu Glu Asp Ala Leu His Leu Arg Ala Glu Ala Thr
100 105 110

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

Thr Val Arg Arg Leu Gln Val Gln Leu Arg Gly Ala Trp Leu Gly Gln
130 135 140

Ala His Gln Glu Phe Glu Thr Leu Lys Ala Arg Ala Asp Lys Gln Ser
145 150 155 160

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

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

Thr Ala Ala Leu Pro Ala
195

<210> 7

5 <211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 7

ES 2 819 866 T3

Leu Gly Thr Glu Val Arg Gln Gly Gln Asp Ala Thr Gln Glu Leu Arg
1 5 10 15

Thr Ser Leu Ser Glu Ile Gln Val Glu Glu Asp Ala Leu His Leu Arg
20 25 30

Ala Glu Ala Thr Ala Arg Ser Leu Gly Glu Val Ala Arg Ala Gln Gln
35 40 45

Ala Leu Arg Asp Thr Val Arg Arg Leu Gln Val Gln Leu Arg Gly Ala
50 55 60

Trp Leu Gly Gln Ala His Gln Glu Phe Glu Thr Leu Lys Ala Arg Ala
65 70 75 80

Asp Lys Gln Ser His Leu Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln Arg
85 90 95

Gln Gln Arg Glu Met Ala Glu Gln Gln Trp Leu Arg Gln Ile Gln
100 105 110

Gln Arg Leu His Thr Ala Ala Leu Pro Ala
115 120

< 210> 8

< 211> 493

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Pro Leu Cys Val Thr Cys Trp Trp Leu Gly Leu Leu Ala Ala
1 5 10 15

ES 2 819 866 T3

Met Gly Ala Val Ala Gly Gln Glu Asp Gly Phe Glu Gly Thr Glu Glu
20 25 30

Gly Ser Pro Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Asn Arg Tyr Lys Arg Ala Gly
35 40 45

Glu Ser Gln Asp Lys Cys Thr Tyr Thr Phe Ile Val Pro Gln Gln Arg
50 55 60

Val Thr Gly Ala Ile Cys Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Val Leu Leu
65 70 75 80

Glu Asn Arg Val His Lys Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asn Asn Glu Leu
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Arg Gln Ile Glu Thr Leu Gln Gln Leu Val Glu Val
100 105 110

Asp Gly Gly Ile Val Ser Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys Glu Ser Arg
115 120 125

Asn Met Asn Ser Arg Val Thr Gln Leu Tyr Met Gln Leu Leu His Glu
130 135 140

Ile Ile Arg Lys Arg Asp Asn Ala Leu Glu Leu Ser Gln Leu Glu Asn
145 150 155 160

Arg Ile Leu Asn Gln Thr Ala Asp Met Leu Gln Leu Ala Ser Lys Tyr
165 170 175

Lys Asp Leu Glu His Lys Tyr Gln His Leu Ala Thr Leu Ala His Asn
180 185 190

Gln Ser Glu Ile Ile Ala Gln Leu Glu Glu His Cys Gln Arg Val Pro
195 200 205

Ser Ala Arg Pro Val Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ala Pro Pro Arg Val
210 215 220

Tyr Gln Pro Pro Thr Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Gln Ile Ser Thr Asn
225 230 235 240

Glu Ile Gln Ser Asp Gln Asn Leu Lys Val Leu Pro Pro Pro Leu Pro
245 250 255

Thr Met Pro Thr Leu Thr Ser Leu Pro Ser Ser Thr Asp Lys Pro Ser
260 265 270

ES 2 819 866 T3

Gly Pro Trp Arg Asp Cys Leu Gln Ala Leu Glu Asp Gly His Asp Thr
275 280 285

Ser Ser Ile Tyr Leu Val Lys Pro Glu Asn Thr Asn Arg Leu Met Gln
290 295 300

Val Trp Cys Asp Gln Arg His Asp Pro Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln
305 310 315 320

Arg Arg Leu Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Arg Asn Trp Glu Thr Tyr
325 330 335

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

Asn Ile Tyr Trp Leu Thr Asn Gln Gly Asn Tyr Lys Leu Leu Val Thr
355 360 365

Met Glu Asp Trp Ser Gly Arg Lys Val Phe Ala Glu Tyr Ala Ser Phe
370 375 380

Arg Leu Glu Pro Glu Ser Glu Tyr Tyr Lys Leu Arg Leu Gly Arg Tyr
385 390 395 400

His Gly Asn Ala Gly Asp Ser Phe Thr Trp His Asn Gly Lys Gln Phe
405 410 415

Thr Thr Leu Asp Arg Asp His Asp Val Tyr Thr Gly Asn Cys Ala His
420 425 430

Tyr Gln Lys Gly Gly Trp Trp Tyr Asn Ala Cys Ala His Ser Asn Leu
435 440 445

Asn Gly Val Trp Tyr Arg Gly Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp
450 455 460

Gly Val Tyr Trp Ala Glu Phe Arg Gly Gly Ser Tyr Ser Leu Lys Lys
465 470 475 480

Val Val Met Met Ile Arg Pro Asn Pro Asn Thr Phe His
485 490

<210> 9

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de polipéptido

10 <400> 9

ES 2 819 866 T3

Leu Glu Asn Arg Val His Lys Gln Glu Leu Glu Leu Asn Asn Glu
1 5 10 15

Leu Leu Lys Gln Lys Arg Gln Ile Glu Thr Leu Gln Gln Leu Val Glu
20 25 30

Val Asp Gly Gly Ile Val Ser Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys Glu Ser
35 40 45

Arg Asn Met Asn Ser Arg Val Thr Gln Leu Tyr Met Gln Leu Leu His
50 55 60

Glu Ile Ile Arg Lys Arg Asp Asn Ala Leu Glu Leu Ser Gln Leu Glu
65 70 75 80

Asn Arg Ile Leu Asn Gln Thr Ala Asp Met Leu Gln Leu Ala Ser Lys
85 90 95

Tyr Lys Asp Leu Glu His Lys Tyr Gln His Leu Ala Thr Leu Ala His
100 105 110

Asn Gln Ser Glu Ile Ile Ala
115

<210> 10

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

< 220>

< 223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

< 400> 10

10 tacatatcta gaatgccagt gcctgctcg tg 32

<210> 11

<211> 27

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

< 220>

< 223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

< 400> 11

20 cgcggatcct caggctggga gcccgc 27

<210> 12

<211> 32

25 <212> ADN<213> Secuencia artificial

< 220>

< 223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

< 400> 12

30 tacatatcta gaatgccagt gcctgctcg tg 32

<210> 13

<211> 30

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

< 220>

< 223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

< 400> 13

cgcggatcct cactcctgcc ccaggagttc 30

<210> 14

<211> 80

ES 2 819 866 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 14

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 Ieu Ala Gln His
20 25 30

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

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

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

10 <210> 15

<211> 240

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

<400> 15

atgccagtgc ctgctctgtg cctgctctgg gccctggcaa tggtgaccgg gcctgcctca 60
gcccccccca tggcgccccca agaactggca cagcatgagg agctgaccct gctttccat 120

gggaccctgc agctgggcca ggccctcaac ggtgtgtaca ggaccacgga gggacggctg 180

acaaggccca ggaacacgctt gggctcttat ggccgcacaa tagaactctt gggcaggag 240

20

<210> 16

<211> 139

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 16

ES 2 819 866 T3

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 Val Ser Arg Gly Arg Asp Ala Ala Gln Glu Leu
 20 25 30

 Arg Ala Ser Leu Leu Glu Thr Gln Met Glu Glu Asp Ile Leu Gln Leu
 35 40 45

 Gln Ala Glu Ala Thr Ala Glu Val Leu Gly Glu Val Ala Gln Ala Gln
 50 55 60

 Lys Val Leu Arg Asp Ser Val Gln Arg Leu Glu Val Gln Leu Arg Ser
 65 70 75 80

 Ala Trp Leu Gly Pro Ala Tyr Arg Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala His
 85 90 95

 Ala Asp Lys Gln Ser His Ile Leu Trp Ala Leu Thr Gly His Val Gln
 100 105 110

 Arg Gln Arg Arg Glu Met Val Ala Gln Gln His Arg Leu Arg Gln Ile
 115 120 125

 Gln Glu Arg Leu His Thr Ala Ala Leu Pro Ala
 130 135

<210> 17
 <211> 420
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 < 220>
 < 223> Secuencia sintética de ácidos nucleicos

10 <400> 17
 atgccagtgc ctgctatgtg cctgctctgg gccctggcaa tggtgaccgg gcctgcctca 60
 gcggtcagcc ggggccccggta tgcaagccagg gaacttcggg caagcctgtt ggagactcag 120

 atggaggagg atattctgca gctgcaggca gaggccacag ctgaggtgtt gggggaggtg 180

 gcccaggcac agaagggtgtt acgggacacgc gtgcagcggc tagaagtcca gctgaggagc 240

 gcctggctgg gccctgccta ccgagaattt gaggtcttaa aggctcacgc tgacaaggcag 300

 agccacatcc tatggggccct cacaggccac gtgcagcggc agaggcggga gatggtggca 360

 cagcagcatc ggctgcgaca gatccaggag agactccaca cagcggcgct cccagcctga 420

15 <210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido
 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (1)..(5)
 < 223> este tramo de aminoácidos se puede repetir hasta 50 veces

25 <400> 18

Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

5 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(1)
 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (2)..(2)
 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3)..(3)
 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

40 <400> 19
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

45 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

60 <400> 20
 Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 21

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido
 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (1)..(5)

10 < 223> este tramo de aminoácidos se puede repetir hasta 20 veces

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(4)

15 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

<400> 21
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

20 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido
 < 220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (1)..(4)

30 < 223> este tramo de aminoácidos se puede repetir hasta 20 veces

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(4)

35 <223> este residuo se puede repetir hasta 20 veces

<400> 22
 Gly Gly Gly Ser
 1

40 <210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de secuencia de polipéptido

<400> 23
 Gly Gly Ser Gly
 1

50 <210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de secuencia de polipéptido

60 <400> 24
 Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 25

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 25
 Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

10 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 26
 Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

20 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<400> 27
 Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

30 <210> 28
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

40 <400> 28
 Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5

45 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(4)
 55 <223> este tramo de aminoácidos se puede repetir hasta 50 veces

<400> 29
 Gly Gly Gly Ser
 1

60 <210> 30
 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética de polipéptido

< 220>

< 221> CARACTERÍSTICA_MISC

< 222> (1)..(5)

< 223> este tramo de aminoácidos se puede repetir hasta 50 veces

10

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 31

15 <211> 4

<212> PRT<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética de polipéptido

20

<400> 31

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 32

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia sintética de polipéptido

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(5)

35 <223> este tramo de aminoácidos se puede repetir hasta 50 veces

<400> 32

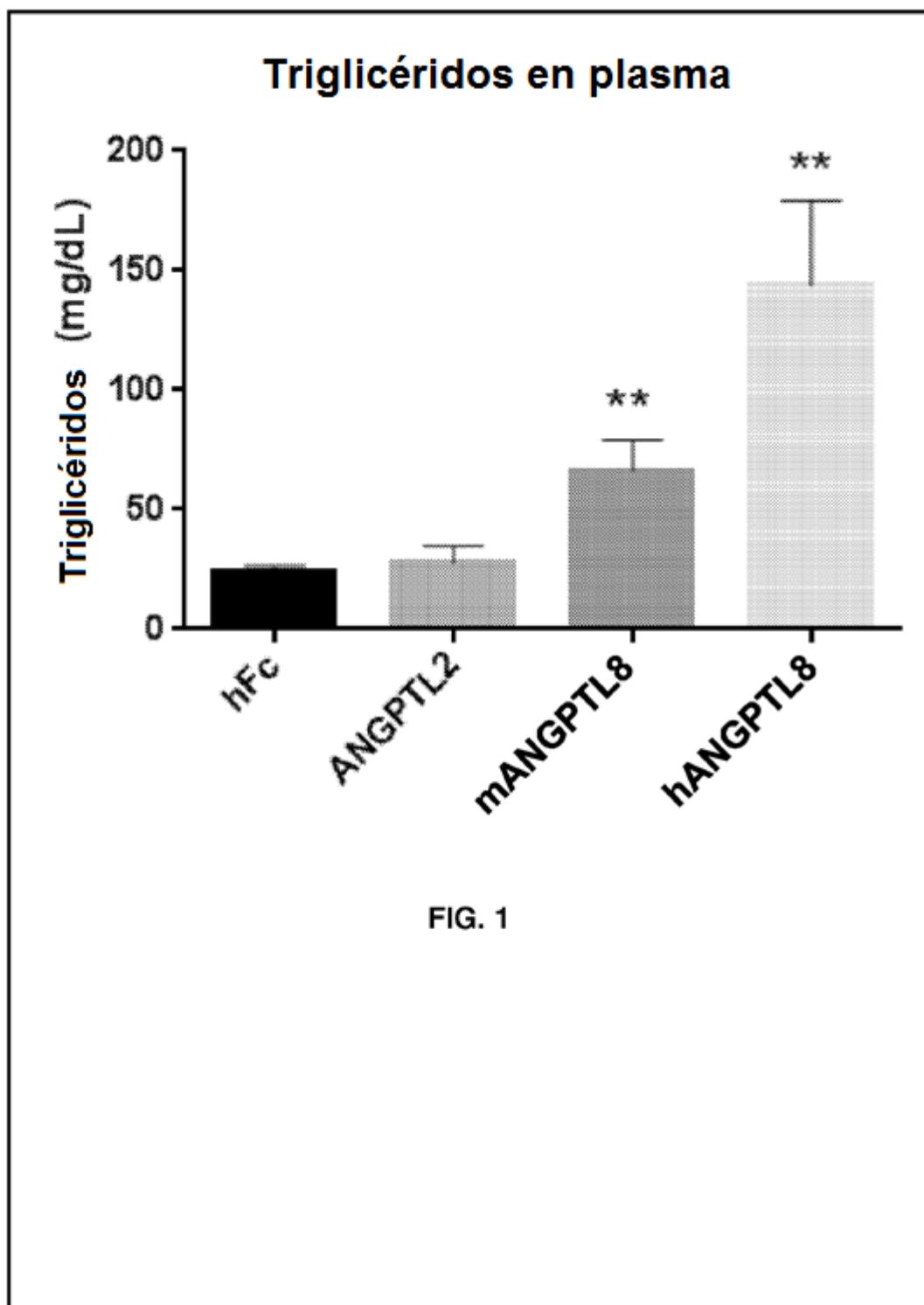
Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO. 1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-70 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO: 1).
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde un polipéptido heterólogo está conjugado con el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido.
3. El polipéptido según la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido heterólogo es albúmina, albúmina de suero humano, o una inmunoglobulina Fc.
- 10 4. El polipéptido según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el polipéptido heterólogo se conjuga con el polipéptido mediante una secuencia enlazadora, opcionalmente en donde la secuencia enlazadora es una secuencia enlazadora escindible o una secuencia enlazadora no escindible.
5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. Un polinucleótido que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica según la reivindicación 5 para uso en un método terapéutico de tratamiento de un sujeto.
- 20 8. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 80-198 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO:1), en donde el polipéptido carece de los aminoácidos 21-70 de ANGPTL8 de longitud completa (SEQ ID NO:1) o una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido para su uso en un método de tratamiento de un sujeto mediante terapia, en donde la terapia es la reducción de los niveles de triglicéridos, niveles de colesterol total, y/o niveles de colesterol LDL en un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar niveles de triglicéridos, colesterol y/o colesterol LDL elevados.
9. El polipéptido o composición para el uso según la reivindicación 7 u 8, en donde el tratamiento forma parte de una terapia de combinación, opcionalmente con estatinas, fibratos, niacina o aceite de pescado.
- 25 10. El polipéptido o composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9,
en donde los niveles de triglicéridos se reducen en al menos 5%, al menos 10%, o al menos el 20% en comparación con los niveles de triglicéridos en el sujeto antes de la administración del polipéptido o la composición farmacéutica.
11. El polipéptido o composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9,
en donde los niveles de colesterol total se reducen en al menos 5%, al menos 10%, o al menos el 20% en comparación con los niveles de colesterol total en el sujeto antes de la administración del polipéptido o la composición farmacéutica.
- 30 12. El polipéptido o composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9,
en donde los niveles de colesterol LDL se reducen en al menos 5%, al menos 10%, o al menos el 20% en comparación con los niveles de colesterol LDL en el sujeto antes de la administración del polipéptido o la composición farmacéutica.
13. El polipéptido o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde el sujeto tiene sobrepeso, es obeso, tiene hiperlipidemia, tiene enfermedad cardiovascular, tiene diabetes, y/o tiene hipotiroidismo.
- 35 14. El polipéptido o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde el sujeto tiene riesgo de desarrollar niveles elevados de triglicéridos.



Diseño de la estructura artificial:

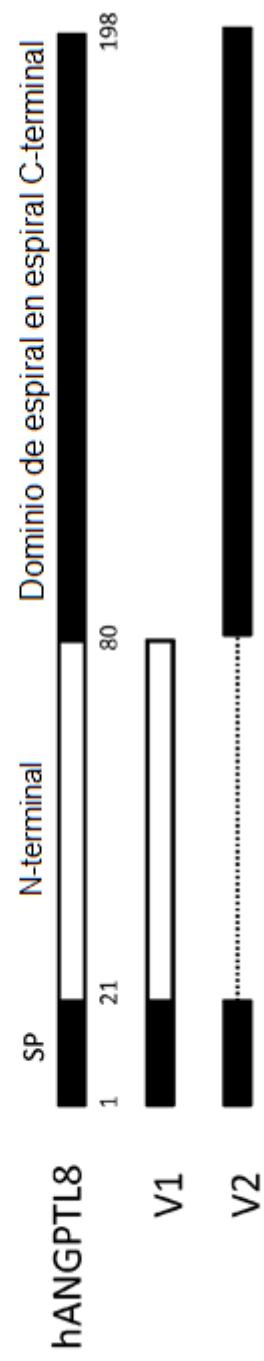


FIG. 2A

Triglicéridos en plasma (pre-AAV)

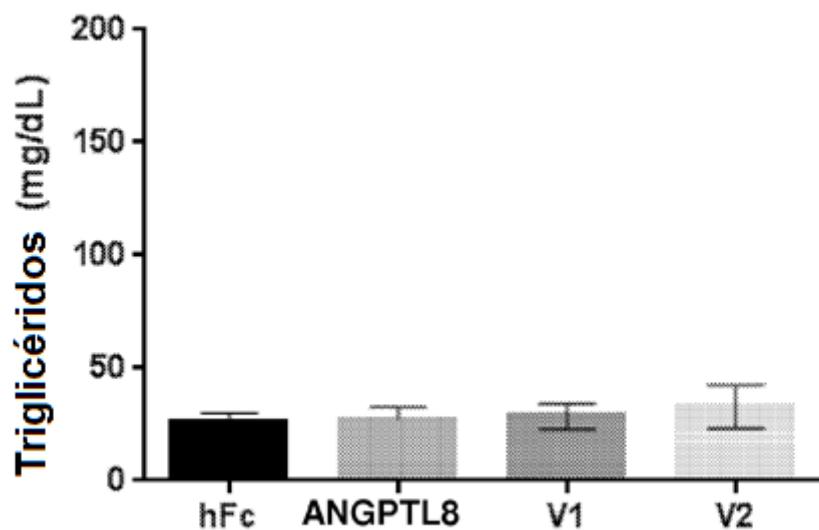


FIG. 2B

Triglicéridos en plasma(wk2)

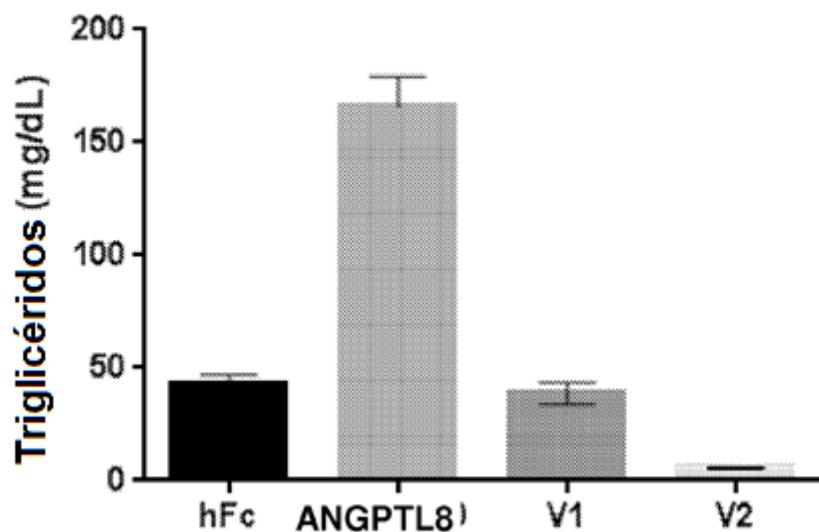


FIG. 2C

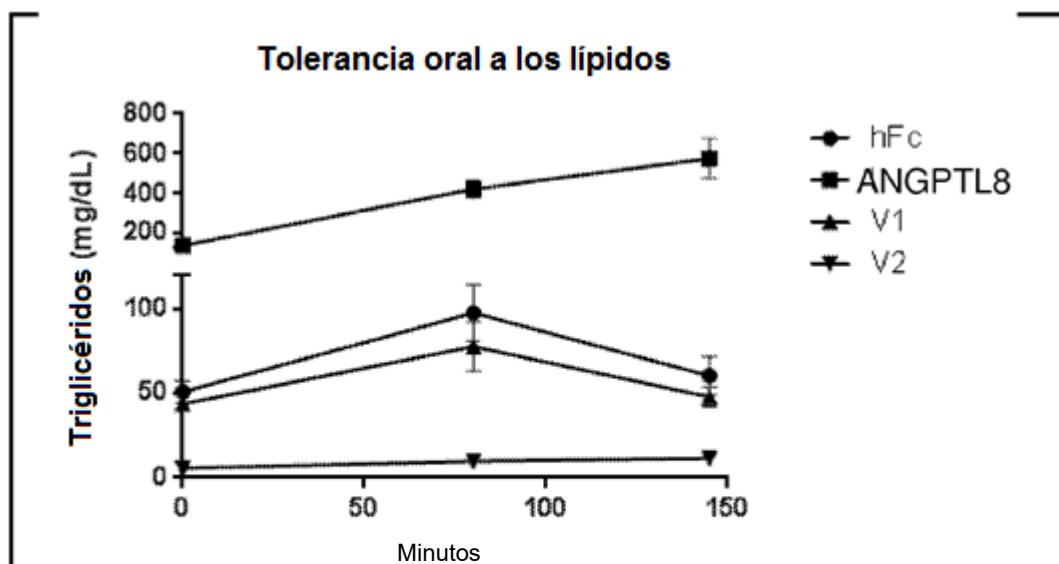


FIG. 3

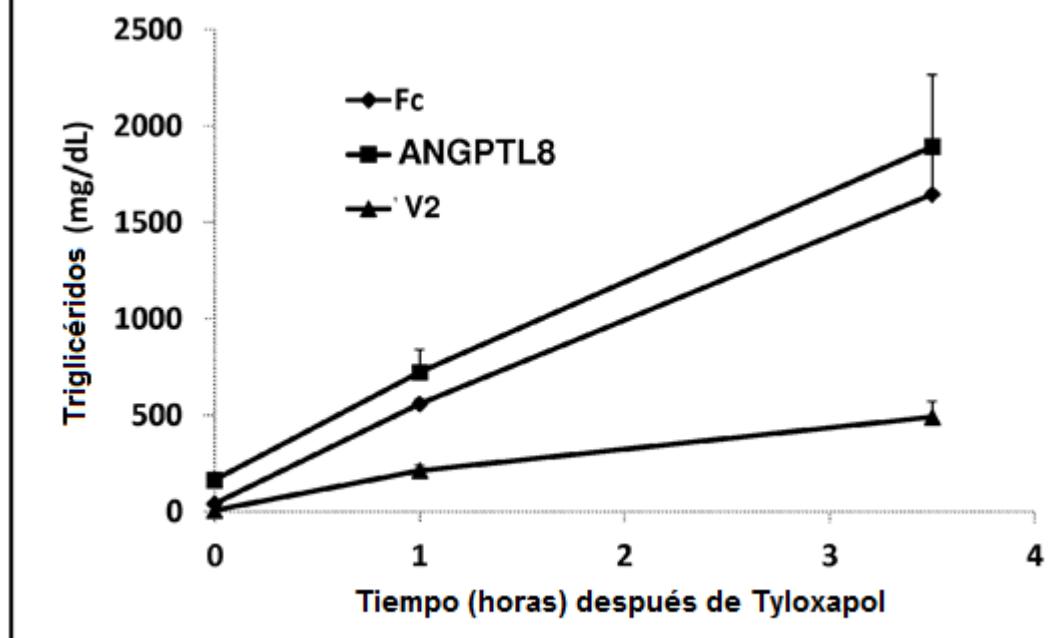


FIG. 4