

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035088**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.27

(21) Номер заявки
201890453

(22) Дата подачи заявки
2016.08.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(54) АНТИ-ANGPTL8 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/202,366**

(32) **2015.08.07**

(33) **US**

(43) **2018.07.31**

(86) **PCT/US2016/045535**

(87) **WO 2017/027316 2017.02.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Гусарова Виктория, Громада Джеспер,
Мерфи Эндрю Дж., Баклер Дэвид Р.
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) Zhang Ren: "OR13-6: A Monoclonal Neutralizing Antibody Against Lipasin (Angptl8), a Novel Lipid Regulator, Reduces Serum Triglycerides in Mice By Enhancing Lipoprotein Lipase-Mediated Triglyceride Clearance", ENDOCRINE SOCIETY'S 97TH ANNUAL MEETING AND EXPO, March 5-8, 2015 - SAN DIEGO CV Risk - Drugs, Sex, and Rock and Roll, 6 March 2015 (2015-03-06), XP002763964, DOI: 10.1210/endo-meetings.2015.DGM.3.OR13-6, Retrieved from the Internet: URL:<http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo-meetings.2015.DGM.3.OR13-6>, [retrieved on 2016-11-08], cited in the application, the whole document

Anonymous: "Product Data Sheet - Purified anti-Betatrophin (ANGPTL8)", BioLegend, 25 July 2014 (2014-07-25), XP002763965, Retrieved from the Internet: URL:http://www.biolegend.com/pop_pdf.php?id=10113, [retrieved on 2016-11-08], the whole document

(57) Изобретение относится к антителам, которые связывают ANGPTL8, и способам их применения. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению связывают человеческий ANGPTL8 с высокой аффинностью. Антитела по изобретению могут быть полностью человеческими антителами. Антитела по изобретению полезны для лечения различных заболеваний или нарушений, частично характеризующихся повышенными уровнями триглицеридов в крови.

B1

035088

035088

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают ангиопоэтин-подобный белок (ANGPTL) 8, композициям, содержащим эти антитела, и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

ANGPTL8 (альтернативно называемый TD26, RIFL, липазин, C19orf80 и бетатрофин) является вновь признанным членом семейства ANGPTL, который вовлечен в метаболизм как триглицеридов (ТГ), так и глюкозы. Он представляет собой циркулирующий белок, экспрессируемый преимущественно в печени и адипозной ткани. В отличие от ANGPTL3 и ANGPTL4, ANGPTL8 лишен фибриноген-подобного домена на С-конце, однако содержит N-концевой биспиральный домен, подобно другим представителям семейства ANGPTL. Филогенетический анализ показывает, что ANGPTL8 имеет общих предков с ANGPTL3 и ANGPTL4 (Fu, Z. et al., (2013), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:1126-1131).

Избыточная экспрессия в печени ANGPTL8 связана с гипертриглицеридемией, в то время как инактивация ANGPTL8 приводит к снижению уровней ТГ в плазме (Quagliarini, F. et al. (2012), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(48):19751-19756; Wang, Y. et al. (2013), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:16109-16114). Несмотря на общее мнение о том, что ANGPTL8 вовлечен в регуляцию уровней липидов, механизм, ответственный за этот процесс, все еще окончательно не установлен. Один из предполагаемых механизмов заключается в том, что ANGPTL8 ингибирует активность липопротеинлипазы (ЛПЛ), приводя к уменьшению гидролиза и клиренса триглицеридов (Zhang, R. et al., (2012), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424:786-792).

Также сообщалось, что ANGPTL8 играл определенную роль в пролиферации бета-клеток и влиял на массу бета-клеток у мышей, когда устойчивость к инсулину была индуцирована антагонистом инсулинового рецептора, S961 (Yi, P. et al. (2013), *Cell* 153:747-758). Однако дальнейшие исследования показали, что ANGPTL8 не нужен для функции бета-клеток или ответа на устойчивость к инсулину в виде роста бета-клеток. Кроме того, избыточная экспрессия ANGPTL8 не приводит к увеличению площади бета-клеток или улучшению гликемического контроля (Gusarova, V. et al. (2014) *Cell* 159:691-696).

Поскольку избыточная экспрессия в печени ANGPTL8 связана с гипертриглицеридемией и поскольку инактивация ANGPTL8 приводит к снижению уровней триглицеридов в плазме, ингибитор или антагонист ANGPTL8 может оказаться эффективным для лечения заболевания, частично характеризующегося повышенными уровнями триглицеридов, такого как, но без ограничения, гипертриглицеридемия.

В публикации Zhang сообщалось, что моноклональное антитело к липазину при введении внутривенной инъекцией мышам дикого типа вызывает снижение сывороточных уровней триглицеридов (Zhang, R. (2015), *Endocrine Society's 97th Annual Meeting, Presentation No. OR13-6, March 5-8, San Diego, CA*). Однако до настоящего времени не были описаны никакие полностью человеческие антитела, специфичные для ANGPTL8, которые могли бы быть использованы в клинической практике для лечения заболеваний или состояний, характеризующихся повышенными уровнями триглицеридов, включая гипертриглицеридемию.

Соответственно в данной области существует потребность в новых антагонистах ANGPTL8, таких как антитела, описанные в настоящем документе, для лечения пациентов, страдающих гипертриглицеридемией и другими заболеваниями или состояниями, связанными с повышенными уровнями триглицеридов и уровнями липидов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают ангиопоэтин-подобный белок 8 (ANGPTL8). Один аспект изобретения относится к человеческим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают/взаимодействуют с ANGPTL8, при этом такое связывание и/или взаимодействие приводит к снижению уровней триглицеридов у млекопитающего.

Соответственно в первом аспекте изобретение относится к полностью человеческим моноклональным антителам (mAb) и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают, нейтрализуют, ингибируют, блокируют, аннулируют, снижают или отрицательно воздействует по меньшей мере на одну активность ANGPTL8, в частности человеческого ANGPTL8 (смотри аминокислоты 22-198 последовательности с регистрационным номером GenBank NP_061157.3 и аминокислоты 1-177 в SEQ ID NO: 340). Активность ANGPTL8, которая может быть нейтрализована, ингибирована, блокирована, аннулирована, снижена или подвергнута отрицательному воздействию за счет антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включает, но без ограничения, ингибирование активности ЛПЛ или снижение уровней триглицеридов *in vivo* и тому подобное.

В одном варианте осуществления изобретение относится к моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывает ANGPTL8 и нейтрализует или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает одной или более из следующих характеристик:

- a) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело;
- b) связывает специфически линейный эпитоп в N-концевой области человеческого ANGPTL8 с по-

следовательностью SEQ ID NO: 337;

с) не связывает линейный эпитоп в N-концевой области человеческого ANGPTL8 с последовательностью SEQ ID NO: 337;

д) не связывает N-концевую биспиральную область человеческого пептида ANGPTL3 с последовательностью SEQ ID NO: 338 или N-концевую биспиральную область человеческого пептида ANGPTL4 с последовательностью SEQ ID NO: 339;

е) связывает человеческий ANGPTL8 при 25°C с величиной K_D менее примерно 150 пМ и связывает обезьяний ANGPTL8 при 25°C с величиной K_D менее примерно 90 пМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса;

ф) вызывает снижение уровней триглицеридов у млекопитающего на примерно 68% (максимум) при подкожном введении в дозе примерно 10 мг/кг;

г) вызывает снижение уровней триглицеридов у млекопитающего на период времени примерно от 7 до 21 дня при подкожном введении в диапазоне доз от примерно 5 до примерно 25 мг/кг;

h) содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314 и 330;

i) содержит вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 и 322; или

ж) перекрестно конкурирует с эталонным антителом, при этом эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любых аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR в табл. 1.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может нейтрализовать, ингибировать, блокировать, аннулировать, снижать или отрицательно воздействовать на активность ч-ANGPTL8 путем связывания эпитопа ч-ANGPTL8, который непосредственно вовлечен в целевую активность ч-ANGPTL8 (например, ЛПЛ-ингибирующую активность ANGPTL8).

В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению может нейтрализовать, ингибировать, блокировать, аннулировать, снижать или отрицательно воздействовать на активность ч-ANGPTL8 путем связывания эпитопа ч-ANGPTL8, который непосредственно не вовлечен в целевую активность ч-ANGPTL8, однако связывание антитела или фрагмента с ним либо за счет стерического перекрытия, либо за счет аллостерических эффектов в сайтах, отличных от поверхности контакта антитело-антиген, может ингибировать, блокировать, аннулировать, снижать или отрицательно воздействовать на целевую активность ч-ANGPTL8.

В другом варианте осуществления антитело или его фрагмент по изобретению связывает эпитоп ч-ANGPTL8, который непосредственно не вовлечен в целевую активность (например, ЛПЛ-ингибирующую активность и тому подобное) ч-ANGPTL8 (то есть не блокирующее антитело), однако антитело или его фрагмент приводит к снижению уровней триглицеридов *in vivo* в сравнении со снижением уровней триглицеридов в отсутствие антитела или его фрагмента.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному анти-ч-ANGPTL8 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает эпитоп, расположенный в N-концевой области на остатках 1-39 в SEQ ID NO: 340 (также представлена как SEQ ID NO: 337).

В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или антигенсвязывающему фрагменту антитела, которое связывает эпитоп, расположенный в N-концевой области человеческого ANGPTL8 на остатках 1-39 в SEQ ID NO: 340 (также представлена как SEQ ID NO: 337), но не связывает N-концевую биспиральную область ч-ANGPTL3 (SEQ ID NO: 338) или N-концевую биспиральную область ч-ANGPTL4 (SEQ ID NO: 339).

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному анти-ч-ANGPTL8 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает эпитоп, расположенный за пределами области человеческого ANGPTL8, состоящей из аминокислотных остатков 1-39 в SEQ ID NO: 340 (также представлена как SEQ ID NO: 337), то есть аминокислотные остатки 40-177 в SEQ ID NO: 340), и нейтрализует, ингибирует, аннулирует, снижает или отрицательно воздействует по меньшей мере на одну активность ч-ANGPTL8.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному анти-ч-ANGPTL8 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает человеческий ANGPTL8 (аминокислотные остатки 1-177 в SEQ ID NO: 340; смотри также аминокислотные остатки 22-198 в последовательности с регистрационным номером GenBank NP_061157.3), но не реагирует перекрестно с родственным белком, таким как человеческий ANGPTL3 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 342, кодируемая нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 343), или человеческий ANGPTL4 (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 344, кодируемая нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 345).

Антитела по изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, Fab, F(ab')₂ или scFv фрагмент) и могут быть модифицированы для изменения функциональных характеристик, например, для увеличения персистенции в организме хозяина или для устранения остаточных эффекторных функций (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). В конкретных вариантах осуществления антитела могут быть биспецифическими.

Иллюстративные анти-ANGPTL8 антитела по настоящему изобретению приведены в настоящем документе в табл. 1 и 2. В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных анти-ANGPTL8 антител. В табл. 2 приведены идентификаторы нуклеотидных последовательностей областей HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных анти-ANGPTL8 антител.

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99 идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), включающую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/250, 266/250, 274/250, 282/250, 290/250, 306/250, 314/322 и 330/322.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 66/74, 162/170, 194/202 и 314/322.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, соответствующих SEQ ID NOs: 162/170.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит (а) три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей переменной области тяжелой цепи (HCVR), приведенных в табл. 1; и (b) три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в любой из последовательностей переменной области легкой цепи (LCVR), приведенных в табл. 1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(а) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308, 316 и 332;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310, 318 и 334;

(с) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320 и 336;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоя-

шей из SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252 и 324;

(е) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254 и 326; и

(ф) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256 и 328.

Настоящее изобретение также относится к антителам, или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99 идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), включающую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1, в сочетании с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-ANGPTL8 антител, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 72/80 (например, H4H15321P), 168/176 (например, H4H15341P), 200/208 (например, H4H15345P) и 320/328 (например, H4H15367P2). В одном варианте осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 168/176 (например, H4H15341P).

Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (то есть HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных анти-ANGPTL8 антител, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 68-70-72-76-78-80 (например, H4H15321P); 164-166-168-172-174-176 (например, H4H15341P); 196-198-200-204-206-208 (например, H4H15345P); 316-318-320-324-326-328 (например, H4H15367P2). В одном варианте осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 представляет собой SEQ ID NOs: 164-166-168-172-174-176 (например, H4H15341P).

В связанном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим набор из шести CDR (то есть HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR любого из иллюстративных анти-ANGPTL8 антител, приведенных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 66/74 (на-

пример, H4H15321P), 162/170 (например, H4H15341P); 194/202 (например, H4H15345P); 314/322 (например, H415367P2). Способы и методы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут быть использованы для идентификации CDR в конкретных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные системы, которые могут быть использованы для определения границ областей CDR, включают, например, систему Kabat, систему Chothia и систему AbM. В общих чертах, система Kabat основана на вариативности последовательностей, система Chothia основана на расположении структурных петлевых областей и система AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia; смотри, например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997) и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Для идентификации последовательностей CDR в антителе также можно использовать общедоступные базы данных.

Настоящее изобретение включает анти-ANGPTL8 антитела, имеющие модифицированную схему гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть полезной модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования, или антитело, лишенное фукозного фрагмента, находящегося на олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (смотри Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других случаях можно использовать модификацию галактозилирования для изменения комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые конкурируют за специфическое связывание ANGPTL8 с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим области CDR из HCVR и области CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в табл. 1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое конкурирует за связывание ANGPTL8 с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/250, 266/250, 274/250, 282/250, 290/250, 306/250, 314/322 и 330/322.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают тот же эпитоп на ANGPTL8, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее области CDR из HCVR и области CDR из LCVR, при этом каждая из HCVR и LCVR имеет аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей HCVR и LCVR, приведенных в табл. 1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывает тот же эпитоп на ANGPTL8, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/250, 266/250, 274/250, 282/250, 290/250, 306/250, 314/322 и 330/322.

В одном варианте осуществления выделенное антитело, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, представляет собой полученное методами рекомбинантной ДНК человеческое моноклональное антитело.

В одном варианте осуществления выделенное антитело, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, представляет собой полученное методами рекомбинантной ДНК человеческое моноклональное антитело, содержащее последовательность HCVR и/или LCVR, выбранную из аминокислотных последовательностей в табл. 1.

В одном варианте осуществления выделенное антитело, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, представляет собой полученное методами рекомбинантной ДНК человеческое моноклональное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/250, 266/250, 274/250, 282/250, 290/250, 306/250, 314/322 и 330/322.

В одном варианте осуществления изобретение относится к полностью человеческому моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое нейтрализует активность ANGPTL8, при этом антитело или его фрагмент обладает одной или более из следующих характеристик: (i) содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314 и 330; (ii) содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 и 322; (iii) содержит домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264,

272, 280, 288, 296, 304, 312, 320 и 336, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256 и 328, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308, 316 и 332, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310, 318 и 334, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252 и 324, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254 и 326, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; (v) связывает специфически N-концевую область человеческого ANGPTL8 с SEQ ID NO: 337; (vi) не связывает специфически N-концевую область человеческого ANGPTL8 с SEQ ID NO: 337; (vii) не связывает N-концевую биспиральную область человеческого пептида ANGPTL3 с SEQ ID NO: 338 или N-концевую биспиральную область человеческого пептида ANGPTL4 с SEQ ID NO: 339; (viii) связывает человеческий ANGPTL8 при 25°C с величиной K_D менее примерно 150 пМ и связывает обезьяний ANGPTL8 при 25°C с величиной K_D менее примерно 90 пМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса; (ix) вызывает снижение уровней триглицеридов у млекопитающего на примерно 68% (максимум) при подкожном введении в дозе примерно 10 мг/кг; (x) вызывает снижение уровней триглицеридов у млекопитающего на период времени примерно от 7 до 21 дня при подкожном введении в диапазоне доз от примерно 5 до примерно 25 мг/кг; (xi) перекрестно конкурирует с эталонным антителом, при этом эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (HCVR) и варибельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из любых аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR в табл. 1.

Во втором аспекте настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим анти-ANGPTL8 антитела или их фрагменты. Например, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1; в конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей HCDR1, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей HCDR2, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую

из аминокислотных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей HCDR3, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей LCDR1, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей LCDR2, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей LCDR3, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим HCVR, при этом HCVR содержит набор из трех CDR (то есть HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как в любом из иллюстративных анти-ANGPTL8 антител, приведенных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим LCVR, при этом LCVR содержит набор из трех CDR (то есть LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как в любом из иллюстративных анти-ANGPTL8 антител, приведенных в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 1, и при этом LCVR содержит любую аминокислотную последовательность из аминокислотных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 1. В конкретных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей HCVR, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любых нуклеотидных последовательностей LCVR, приведенных в табл. 2, или, по существу, аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с ней. В конкретных вариантах осуществления данного аспекта изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, при этом как HCVR, так и LCVR, происходят из одного и того же анти-ANGPTL8 антитела, приведенного в табл. 1.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным экспрессионным векторам, способным экспрессировать полипептид, содержащий переменную область тяжелой или легкой цепи анти-ANGPTL8 антитела. Например, настоящее изобретение охватывает рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из молекул нуклеиновой кислоты, упомянутых выше, то есть молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в табл. 1. В объем настоящего изобретения также входят клетки-хозяева, в которые введены такие векторы, и способы получения антител, или их фрагментов, путем культивирования клеток-хозяев в условиях, допускающих продуцирование антител, или фрагментов антител, и извлечения полученных таким образом антител и фрагментов антител.

В одном варианте осуществления выделенное антитело, которое специфически связывает и/или ингибирует по меньшей мере одну активность, связанную с ANGPTL8, представляет собой полученное методами рекомбинантной ДНК человеческое моноклональное антитело, содержащее HCVR и/или LCVR, кодируемые нуклеотидной последовательностью, выбранной из нуклеотидных последовательностей в табл. 2.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий ANGPTL8, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (а) определяющие ком-

плементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющие аминокислотные последовательности, приведенные в табл. 1; и (b) области CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющие аминокислотные последовательности, приведенные в табл. 1.

В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его фрагмент, которое специфически связывает человеческий ANGPTL8, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCVR, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 1, и LCVR, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 1.

В третьем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает ANGPTL8, и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно антитело, специфичное для человеческого ANGPTL8, выбранное из любых анти-ANGPTL8 антител, или их антигенсвязывающих фрагментов, приведенных в табл. 1, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В связанном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей сочетание анти-ANGPTL8 антитела и второго терапевтического средства. В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство представляет собой любое средство, которое полезно комбинировать с анти-ANGPTL8 антителом.

В одном варианте осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, способное вызывать снижение уровней триглицеридов или ослабление по меньшей мере одного симптома у пациента, страдающего заболеванием или состоянием, характеризующимся высокими уровнями триглицеридов, таким как гипертриглицеридемия.

В конкретных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой средство, которое помогает нейтрализовать или уменьшать любой возможный побочный эффект(ы), связанный с применением антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по изобретению в случае наличия такого побочного эффекта(ов).

Второе терапевтическое средство может представлять собой низкомолекулярное лекарственное средство, белок/полипептид, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, такую как антисмысловая молекула или кРНК. Второе терапевтическое средство может быть синтетическим или существующим в природе.

Следует также понимать, что антитела и фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению можно использовать в других видах комбинированной терапии, например антитела и фармацевтически приемлемые композиции могут быть использованы одновременно, до, либо после, одного или более других желательных терапевтических средств или медицинских процедур. При выборе конкретного сочетания видов терапии (терапевтических средств или процедур) для использования в комбинированном режиме лечения следует учитывать совместимость желательных терапевтических средств и/или процедур и желательный терапевтический эффект, которого предстоит добиться. Следует также понимать, что с используемыми видами терапии может быть достигнут желаемый эффект для того же самого заболевания (например, антитело можно вводить одновременно с другим средством, используемым для лечения того же самого заболевания), или с их помощью могут быть достигнуты другие эффекты (например, контроль каких-либо неблагоприятных эффектов). При описании в настоящем документе подходящими для заболевания или состояния, подвергаемого лечению, являются дополнительные терапевтические средства, которые обычно вводят для лечения или предотвращения конкретного заболевания или состояния.

В связанном варианте осуществления изобретение относится к композиции, которая представляет собой сочетание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению и второго терапевтического средства, такого как (1) ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А (HMG-CoA) редуктазы, такие как церивастатин, аторвастатин, симвастатин, питавастатин, розувастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин и тому подобное; (2) ингибиторы поглощения холестерина и/или повторного поглощения желчных кислот; (3) ниацин, способствующий усилению катаболизма липопротеинов; (4) фибраты или амфипатические карбоновые кислоты, вызывающие снижение уровня ТГ, уровня липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и повышение уровней липопротеинов высокой плотности (ЛВП); и (5) активаторы фактора транскрипции LXR, который участвует в элиминации холестерина, такие как 22-гидроксихолестерин, или фиксированные комбинации, такие как эзетимиб плюс симвастатин; статин с секвестрантом желчных кислот (например, холестирамин, колестипол, колесевилам), фиксированная комбинация ниацин плюс статин (например, ниацин с ловастатином); или другие снижающие уровень липидов средства, такие как этиловые эфиры омега-3-жирных кислот (например, омакор).

Кроме того, второе терапевтическое средство может представлять собой один или более других ингибиторов ANGPTL8, а также ингибиторы других молекул, таких как ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6, аполипопротеин С-III (APOC3) и пробелок конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), которые вовлечены в метаболизм липидов, в частности гомеостаз холестерина и/или триглицеридов. Ин-

гибиторы этих молекул включают малые молекулы, бессмысловые молекулы и антитела, которые специфически связывают эти молекулы и блокируют их активность.

В одном варианте осуществления, если анти-ANGPTL8 антитела по изобретению используют для лечения такого заболевания, как диабет (например, диабет 2 типа), то эти антитела можно использовать в сочетании с одним или более из следующих антидиабетических терапевтических средств, которые доступны в настоящее время. К ним относятся инсулин, аналог инсулина (смотри ниже), бигуанид (метформин), сульфонилмочевина (например, глибурид, глипизид), агонист рецепторов PPAR-гамма (например, пиоглитазон, розиглитазон), ингибитор альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, воглибоз), агонист рецепторов глюкагонподобного пептида 1 (GLP-1) (например, баета® (эксенатид), труклисити™ (дулаглутид), виктоза® (лираглутид), ликсумия® (ликсисенатид), танзеум™ (албиглутид), ингибитор дипептидилпептидазы IV (DPP-4) (например, саксаглиптин (онглиза®), ситалиптин (янувия®) и видаглиптин (галвус®)), ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2) (например, инвокана™ (канаглифлозин), форксига® (дапаглифлозин), эмпаглифлозин, ипраглифлозин, тофоглифлозин), симлин® (прамлинтид), антагонист рецепторов глюкагона (описанный, например, в US8545847) и антагонист глюкагона.

В некоторых связанных вариантах осуществления композиция может содержать второе средство, выбранное из группы, состоящей из несульфонилмочевинных секретогогов, аналогов инсулина, включая аналоги быстрого действия (например, лиспро, аспарт, глулизин) и длительного действия (например, инсулин детемир, инсулин деглудек или инсулин гларгин), полипептидов эксендина-4, агонистов бета-3 адренорецепторов, ингибиторов поглощения холестерина и/или повторного поглощения желчных кислот, антагонистов ЛНП-холестерина, антагонистов белка-переносчика холестерина эфиров (например, торцетрапиб, анацетрапиб, далцетрапиб или эвацетрапиб), антагонистов рецепторов эндотелина, антагонистов гормона роста, сенсibilизаторов инсулина, миметиков или агонистов амилина, антагонистов каннабиноидных рецепторов, агонистов рецепторов глюкагонподобного пептида 1, меланокортинов, агонистов рецепторов меланинконцентрирующего гормона, СИОЗСН, миметика фактора роста фибробластов 21 (FGF21) (смотри, например, US20110002845 и US20080261236), агониста рецепторов 1с фактора роста фибробластов (FGFR1с) (смотри, например, US20110150901), ингибитора образования конечного продукта усиленного гликозилирования, такого как, но без ограничения, аминогуанидин, и ингибиторов протеин-тирозин фосфатазы.

В связанных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой одно или более других терапевтических средств, таких как анальгетики, противовоспалительные средства, включая нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВС), такие как ингибиторы Cox-2 и тому подобное, для облегчения и/или уменьшения симптомов, сопутствующих основному состоянию, при необходимости.

В четвертом аспекте изобретение относится к способу нейтрализации, ингибирования, блокирования, аннулирования, снижения или отрицательного воздействия по меньшей мере на одну активность, связанную с ANGPTL8, у пациента, который нуждается в этом, включающему введение любого одного или более антител по изобретению, приведенных в табл. 1, или фармацевтической композиции, содержащей любое одно или более из этих антител, пациенту, который нуждается в этом, при этом по меньшей мере одна активность, связанная с ANGPTL8, снижается или уменьшается.

В одном варианте осуществления изобретение относится к терапевтическому способу, включающему введение субъекту, который нуждается в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей одно или более анти-ч-ANGPTL8 антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению и, необязательно, одно или более дополнительных терапевтических средств, описанных выше.

В пятом аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, частично связанного с повышенной экспрессией и/или активностью ANGPTL8, включающему введение ингибитора/антагониста ANGPTL8, при этом ингибитор/антагонист ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичное для ANGPTL8. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфичное для ANGPTL8, содержит HCVR, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей в табл. 1, и LCVR, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей в табл. 1.

В одном варианте осуществления заболевание или нарушение, которое можно лечить способами по изобретению, представляет собой любое заболевание или состояние, которое облегчается, ослабляется, ингибируется или предотвращается, либо уменьшается тяжесть или частота проявления по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием, в сравнении с ситуацией в отсутствие лечения анти-ч-ANGPTL8 антителом (например, ANGPTL8-опосредуемые заболевания или нарушения), за счет устранения, ингибирования, снижения или иного отрицательного воздействия на активность ANGPTL8. Примеры заболеваний или нарушений, которые можно лечить способами по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, те, которые связаны с метаболизмом липидов, такие как гиперлипидемия, гиперлиппротеинемия и дислипидемия, включая атерогенную дислипидемию, диабетическую дислипидемию,

гипертриглицеридемия, включая тяжелую гипертриглицеридемию с уровнем ТГ >1000 мг/дл и сопутствующим острым панкреатитом, гиперхолестеринемия, хиломикронемия, смешанная дислипидемия (ожирение, метаболический синдром, диабет и так далее), липодистрофия, липоатрофия и тому подобное, которые вызываются, например, снижением активности ЛПЛ и/или дефицитом ЛПЛ, изменением ApoC2, дефицитом ApoE, увеличением уровней ApoB, увеличением продуцирования и/или уменьшением элиминации липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), лечением некоторыми лекарственными средствами (например, вызываемая лечением глюкокортикоидами дислипидемия), любой генетической предрасположенностью, диетой, образом жизни и тому подобным.

Способы по изобретению также позволяют предотвращать или лечить заболевания или нарушения, связанные с, или вызываемые, триглицеридемией, гипертриглицеридемией, гиперлипидемией, гиперлипопротеинемией и/или дислипидемией, включая, но без ограничения, сердечно-сосудистые заболевания или нарушения, такие как атеросклероз, аневризма, гипертензия, стенокардия, инсульт, цереброваскулярные заболевания, застойная сердечная недостаточность, болезни коронарных артерий, инфаркт миокарда, болезни периферических сосудов и тому подобное; острый панкреатит; неалкогольный стеатогепатит (НАСГ); нарушение содержания сахара в крови, такое как диабет; ожирение и тому подобное.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одно антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать для лечения ассоциированных с метаболическим синдромом дислипидемии, ожирения, или для предотвращения увеличения массы тела, или для поддержания нормальной массы тела.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу снижения уровней триглицеридов в крови, либо лечения состояния или заболевания, связанного с, или частично характеризующегося, повышенными уровнями триглицеридов в крови, или по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с состоянием или заболеванием, который включает введение фармацевтической композиции, содержащей одно или более антител, специфичных для человеческого ANGPTL8, из табл. 1, пациенту, который нуждается в этом, в результате чего уровни триглицеридов снижаются, либо состояние или заболевание ослабляется, либо по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированное с состоянием или заболеванием, облегчается или степень его тяжести уменьшается.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по изобретению можно использовать отдельно или в сочетании с вторым или третьим терапевтическим средством для лечения гипертриглицеридемии, либо по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с гипертриглицеридемией, или можно использовать для лечения пациента, имеющего риск развития гипертриглицеридемии, например пациента, имеющего генетическую предрасположенность к развитию гипертриглицеридемии, например семейной гипертриглицеридемии, или семейной дисбеталипопротеинемии.

Другие состояния могут предрасполагать пациента к повышению уровней триглицеридов. Например, некоторые лекарственные препараты, такие как бета-блокаторы, пилюли для контрацепции, диуретики, стероиды, либо использование тамоксифена, могут приводить к повышению уровней триглицеридов и, следовательно, могут повышать вероятность того, что у пациента разовьются состояния или осложнения, связанные с высокими уровнями триглицеридов, такие как атеросклероз, инсульт, сердечный приступ и другие кардиологические состояния.

Кроме того, некоторые другие состояния могут приводить к повышению уровней триглицеридов, включая ожирение, плохо контролируемый диабет, гипотиреоз, заболевание почек или употребление спиртных напитков.

В одном варианте осуществления антитела могут быть использованы для предотвращения начала заболевания или нарушения, частично характеризующегося повышенными уровнями триглицеридов в крови, или для предотвращения вероятности развития такого заболевания или нарушения, или для снижения степени тяжести заболевания или нарушения, либо по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением. Предполагается, что антитела по изобретению могут быть использованы отдельно либо в качестве вспомогательной терапии с другими средствами или способами, известными в качестве стандарта оказания медицинской помощи пациентам, страдающим заболеваниями или состояниями, частично характеризующимися повышенными уровнями триглицеридов в крови, такими как, но без ограничения, гипертриглицеридемия. Такая стандартная терапия может включать введение жидкости или введение любых других фармацевтических средств, полезных для снижения в крови уровней триглицеридов или липидов, или для снижения массы тела.

В одном варианте осуществления применение антител, описанных в настоящем документе, может быть эффективным средством для достижения нормальных уровней триглицеридов и, как следствие, ослабления, или предотвращения, одного или более симптомов, либо долгосрочных осложнений, ассоциированных с заболеванием, характеризующимся высокими уровнями триглицеридов.

В одном варианте осуществления антитела по изобретению могут быть использованы для производства лекарственного средства, предназначенного для лечения любого заболевания или нарушения, частично характеризующегося повышенными уровнями триглицеридов.

Антитела по изобретению могут быть использованы в качестве краткосрочной терапии в экстрен-

ных случаях или они могут быть предусмотрены для долгосрочного использования в качестве постоянной терапии.

Другие варианты осуществления станут очевидными при изучении подробного описания.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены средние значения \pm SEM для сывороточных концентраций триглицеридов и общего холестерина у мышей, гуманизированных в отношении ANGPTL8, которым вводили подкожно одну дозу H4H15341P. Введенные дозы составляли 1, 5, 10 или 25 мг/кг в день 0 исследования. Статистические сравнения проводили методом 2-факторного дисперсионного анализа различий с контрольными Ат, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

На фиг. 2 показаны уровни циркулирующего человеческого антитела после подкожного введения одной дозы H4H15341P, составляющей 1, 5, 10 или 25 мг/кг.

На фиг. 3 показан эффект мАт H4H15341P на сывороточные уровни липопротеинлипазы (ЛПЛ) и печеночной липазы у мышей с ANGPTL8 в сравнении с контрольным антителом. Для статистической обработки использовали непарный критерий Стьюдента; ** $p < 0,01$.

На фиг. 4 показан эффект мАт H4H15341P в тесте на толерантность к липидам у мышей с ANGPTL8. Оценивали эффект ведения мАт H4H15341P на снижение уровней триглицеридов после острой жировой нагрузки в сравнении с контрольным антителом. Для статистической обработки использовали 2-факторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони; **** $p < 0,0001$.

Подробное описание изобретения

Прежде чем перейти к описанию настоящего изобретения, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, следовательно, способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не должна быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится данное изобретение. В настоящем документе термин "примерно" при использовании применительно к конкретной приведенной числовой величине означает, что величина может отличаться от приведенной величины не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "примерно 100" включает 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и так далее).

Хотя любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, предпочтительные методы и материалы описаны далее. Все патенты, патентные заявки и не патентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Определения.

"Ангиопоэтин-подобный белок 8", или "ANGPTL8", является представителем семейства белков ангиопоэтинов, и иногда его называют TD26, RIFL, липазинном, C19orf80 и бетатрофином. Используемый в настоящем документе термин "ANGPTL8" относится к человеческому ANGPTL8, содержащему аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотным остаткам 1-177 в SEQ ID NO: 340. Полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого ANGPTL8, включая сигнальную последовательность, также имеет регистрационный номер GenBank NP_061157.3, в то время как полноразмерная нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий ANGPTL8, имеет регистрационный номер GenBank NM_018687.6. N-концевой биспиральный домен человеческого ANGPTL8 охватывает аминокислотные остатки 1-39 в SEQ ID NO: 340 и также соответствует SEQ ID NO: 337. В настоящем документе все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты должны относиться к человеческому варианту соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если только четко не указано, что они получены из другого биологического вида. Таким образом, термин "ANGPTL8" означает человеческий ANGPTL8, если только специально не указано, что он является белком другого биологического вида, например "мышинный ANGPTL8", "обезьяний ANGPTL8" и так далее.

Используемый в настоящем документе термин "человеческий ангиопоэтин-подобный белок 3", или "ч-ANGPTL3", относится к ANGPTL3, имеющему нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 343, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 342, либо его биологически активному фрагменту. N-концевой биспиральный домен человеческого ANGPTL3 соответствует SEQ ID NO: 338.

Используемый в настоящем документе термин "человеческий ангиопоэтин-подобный белок 4", или "ч-ANGPTL4", относится к ANGPTL4, имеющему нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 345, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 344, либо его биологически активному фрагменту. N-концевой биспиральный домен человеческого ANGPTL4 соответствует SEQ ID NO: 339.

В конкретных вариантах осуществления антитело или фрагменты антитела по изобретению могут

быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как второй антагонист ANGPTL8 или любой другой терапевтический фрагмент, используемый для лечения заболевания или состояния, частично вызванного повышенными уровнями триглицеридов.

Используемый в настоящем документе термин "анти-ANGPTL8 антитело" охватывает как одновалентные антитела с одной специфичностью, так и биспецифические антитела, содержащие первое плечо, связывающее ANGPTL8, и второе плечо, связывающее второй (целевой) антиген, при этом анти-ANGPTL8 плечо содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в табл. 1 настоящего документа.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу, или молекулярный комплекс, содержащую по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, ANGPTL8). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем документе LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые перемежаются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных вариантах осуществления изобретения области FR анти-ANGPTL8 антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны человеческим последовательностям иммуноглобулинов зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным образом. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определять на основании параллельного анализа двух или более областей CDR.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" также охватывает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобные включают любой природный, получаемый с помощью ферментов, синтетический или генетически модифицированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген, образуя комплекс.

Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление, или генно-инженерных методов рекомбинантной ДНК, включающих манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такие ДНК известны и/или легкодоступны, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), либо могут быть синтезированы. ДНК можно секвенировать и изменять химическими или молекулярно-биологическими методами, например, для сборки одного или более переменных и/или константных доменов в соответствующую конфигурацию, либо для введения кодонов, включения остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и так далее.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают (i) Fab-фрагменты; (ii) $F(ab')_2$ -фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные узнающие компоненты, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как антитела со специфическим доменом, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и так далее), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охвачены используемым в настоящем документе термином "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены по отношению друг к другу в любой подходящей конфигурации. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним констант-

ным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут иметь место в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций, приведенных выше, переменные и константные домены либо могут быть связаны непосредственно друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной областью шарнира или линкера. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, результатом чего является гибкая или полугибкая связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, приведенных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, за счет дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае полноразмерных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими).

Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен к специфическому связыванию отдельного антигена или другого эпитопа на том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в настоящем документе, может быть приспособлен для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием рутинных методов, известных в данной области.

Используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" должен включать не существующие в природе человеческие антитела. Термин охватывает антитела, полученные методами рекомбинантной ДНК в организме млекопитающего, отличного от человека, или в клетках млекопитающего, отличного от человека. Термин не должен относиться к антителам, выделенным из, или образованным в организме человека.

В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" должен охватывать все человеческие антитела, которые были получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными методами, например антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (подробно описано ниже), антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител (подробно описано ниже), антитела, полученные от животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам человеческих иммуноглобулинов (смотри, например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК. В конкретных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают *in vitro* мутагенезу (или, в случае использования животных, трансгенных в отношении последовательностей человеческих Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и являются родственными последовательностям V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не существовать естественным образом в репертуаре последовательностей антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильный четырехцепочечный конструктор массой примерно 150-160 кДа, в котором димеры удерживаются вместе дисульфидными связями между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула массой примерно 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Такие формы очень сложно разделять, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изоформах интактных IgG зависит от, но без ограничения, структурных различий, связанных с изоформой шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области человеческого IgG4 может приводить к существенному уменьшению появления второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно имеющих место в случае шарнирной области человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций шарнире, области C_H2 или C_H3 , что может быть желательным, например, в производстве, для повышения выхода желательной формы антитела.

Антитела по изобретению могут представлять собой выделенные антитела. Используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и отделено от, и/или извлечено из, по меньшей мере одного компонента его естественного окружения. Например, для целей настоящего изобретения антитело, которое было отделено от, или извлечено из, по

меньшей мере одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело естественным образом существует или естественным образом продуцируется, представляет собой "выделенное антитело". Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. В конкретных вариантах осуществления выделенное антитело может быть, по существу, свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Анти-ANGPTL8 антитела, раскрытые в настоящем документе, могут иметь одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в областях каркаса и/или CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей. Такие мутации могут быть с легкостью установлены при сравнении аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, с последовательностями, полученными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, имеющие одну или более мутаций, можно тестировать на наличие одного или более желательных свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, усовершенствованные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), сниженная иммуногенность и так далее. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общепринятым способом, входят в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает анти-ANGPTL8 антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, имеющие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает анти-ANGPTL8 антитела, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и так далее консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR в табл. 1 настоящего документа.

Используемые в настоящем документе термины "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело" (или "антитело, которое нейтрализует активность ANGPTL8") относятся к антителу, связывание и/или взаимодействие которого с ANGPTL8 приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности ANGPTL8. Например, антитело по изобретению может ингибировать ингибирующую липопропротеинлипазу активность ANGPTL8, или оно может приводить к снижению уровней триглицеридов в плазме за счет механизма, иного, чем посредством ингибирования ЛПЛ-ингибирующей активности ANGPTL8. Такое ингибирование биологической активности ANGPTL8 можно оценивать путем измерения одного или более показателей биологической активности ANGPTL8 в одном или более из нескольких стандартных *in vitro* или *in vivo* анализов, известных в данной области. Изменяемой активностью является снижающая уровень триглицеридов активность, связанная с антителом по изобретению.

Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс", или "ППР", означает оптическое явление, позволяющее анализировать в реальном времени взаимодействие биологических молекул путем обнаружения изменений концентраций белка в биосенсорной матрице, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden и Piscataway, N.J.) или системы MASS-1 (Sierra Sensors, Hamburg, Germany и Greenville, RI).

Используемый в настоящем документе термин " K_D " означает равновесную константу диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут оказывать разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными.

Конформационный эпитоп образуется за счет пространственного сближения аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых случаях эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

Выражения "существенная идентичность" или "по существу идентичные" применительно к нуклеиновым кислотам или их фрагментам указывают на то, что при оптимальном выравнивании, с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями, с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность нуклеотидных последовательностей составляет по меньшей мере примерно 95% и более предпочтительно по меньшей мере примерно 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, при измерении с использованием любого хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может, в некоторых случаях, кодировать полипептид, имеющий ту же, или, по существу, сходную аминокислотную последовательность, что и у полипептида, кодируемого эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам выражения "существенная идентичность" или "по существу идентичные" означают, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например,

при помощи программ GAP или BESTFIT с использованием штрафа за делеции по умолчанию имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичности последовательностей. Предпочтительно остатки, которые не являются идентичными, являются следствием консервативных аминокислотных замен. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена не приводит к существенному изменению функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательностей или степень сходства может быть скорректирована в сторону повышения для внесения поправки на консервативный характер замен. Способы такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области; смотри, например, публикацию Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, включенную в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи с аналогичными химическими свойствами, включают аминокислоты с (1) алифатическими боковыми цепями: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатическими гидроксильными боковыми цепями: серин и треонин; (3) амид-содержащими боковыми цепями: аспарагин и глутамин; (4) ароматическими боковыми цепями: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основными боковыми цепями: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислыми боковыми цепями: аспартат и глутамат, и (7) сера-содержащими боковыми цепями: цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в логарифмической матрице вероятности PAM250, описанной в публикации Gonnet et al. (1992) *Science* 256:1443-1445, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в логарифмической матрице вероятности PAM250.

Сходство последовательностей в случае полипептидов, как правило, измеряют с использованием программ анализа последовательностей. Программа анализа белков сопоставляет сходные последовательности с использованием меры сходства, присвоенной различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программы GCG включают такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов, или между белком дикого типа и его мутантом; смотри, например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием программы FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определение процентной идентичности последовательностей областей наилучшего совпадения между искомой последовательностью и последовательностью-находкой (Pearson (2000), выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое число последовательностей из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию; смотри, например, публикации Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Выражение "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое обеспечивает желаемый эффект, ради которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения, и может быть определено специалистом в данной области известными методами (смотри, например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Используемые в настоящем документе термины "лечение" или "терапия" означают подход для получения полезных или желательных клинических результатов. В одном варианте осуществления изобретения полезный или желательный клинический результат включает, но без ограничения, снижение уровней триглицеридов в крови, либо облегчение одного или более состояний, заболеваний, либо симптомов, ассоциированных с, или вызванных, повышенными уровнями триглицеридов, включая, но без ограничения, гипертриглицеридемию и так далее.

pH-Зависимое связывание.

Настоящее изобретение охватывает анти-ANGPTL8 антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, анти-ANGPTL8 антитело по настоящему изобретению может демонстрировать ослабление связывания с ANGPTL8 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно, анти-ANGPTL8 антитела по изобретению могут демонстрировать усиление связывания с ANGPTL8 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислый pH" включает значения pH менее примерно 6,2, например примерно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое в настоящем документе выражение "нейтральный pH" означает значение pH от примерно 7,0 до примерно 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значе-

ния pH примерно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях "ослабление связывание с ANGPTL8 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" выражают в виде отношения значения K_D связывания антитела с ANGPTL8 при кислом pH к значению K_D связывания антитела с ANGPTL8 при нейтральном pH (или наоборот). Например, для целей настоящего изобретения можно считать, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, демонстрирует "ослабление связывания с ANGPTL8 при кислом pH по сравнению с нейтральным pH", если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризуется отношением K_D в кислой/нейтральной среде, составляющем примерно 3,0 или более. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления отношение K_D в кислой/нейтральной среде для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять примерно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или более.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на ослабленное (или усиленное) связывание с конкретным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут приводить к получению антител с pH-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина может быть получено антитело, отличающееся ослабленным связыванием антигена при кислом pH по сравнению с нейтральным pH.

Анти-ANGPTL8 антитела, содержащие варианты Fc.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены анти-ANGPTL8 антитела, содержащие Fc-домен, имеющий одну или более мутаций, которые приводят к усилению или ослаблению связывания антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает анти-ANGPTL8 антитела, имеющие мутацию в области C_H2 или C_H3 Fc-домена, при этом мутация(и) приводит к увеличению аффинности Fc-домена в отношении FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH находится в диапазоне от примерно 5,5 до примерно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении его животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация представляет собой модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию в положениях 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию в положении 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В другом варианте осуществления модификация представляет собой модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, настоящее изобретение включает анти-ANGPTL8 антитела, содержащие Fc-домен, имеющий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A), а также 433K и 434F (например, H433K и N434F). Все возможные сочетания вышеперечисленных мутаций в Fc-домене, а также другие мутации в вариабельных доменах антител, раскрытых в настоящем документе, входят в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает анти-ANGPTL8 антитела, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), при этом химерная область C_H содержит сегменты из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулинов. Например, антитела по изобретению могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2 из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4 в сочетании с частью или всем доменом C_H3 из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению содержат химерную область C_H, имеющую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки в положениях от 216 до 227 в соответствии с нумерацией ЕС) из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4 в сочетании с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки в положениях от 228 до 236 в соответствии с нумерацией ЕС) из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки из верхней шарнирной области человеческого IgG1 или человеческого IgG4 и аминокислотные остатки из нижней шарнирной области человеческого IgG2. В конкретных вариантах осуществления антитело, со-

держашее химерную область C_H, описанную в настоящем документе, может проявлять модифицированные эффекторные функции Fc без отрицательного влияния на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела (смотри, например, предварительную патентную заявку США 61/759578, поданную 1 февраля 2013 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

Биологические характеристики антител.

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают ANGPTL8 с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение относится к анти-ANGPTL8 антителам, которые связывают человеческий или обезьяний ANGPTL8 с величиной K_D менее примерно 150 нМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при 25°C, или при 37°C, например, с использованием рекомбинантного продукта слияния белка ANGPTL8 с C-концевой областью Fc IgG2a мыши в формате анализа, описанного в примерах 3 и 4 настоящего документа, или, по существу, в аналогичном анализе. В некоторых вариантах осуществления предложены анти-ANGPTL8 антитела, которые связывают человеческий или обезьяний ANGPTL8 при 25 или 37°C с величиной K_D менее примерно 90 или менее примерно 50, менее примерно 3, менее примерно 2, менее примерно 1 нМ, менее примерно 900, менее примерно 500, менее примерно 300, менее примерно 150 или менее примерно 90 пМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса, например, в формате анализа, описанного в примерах 3 и 4 настоящего документа, или, по существу, в аналогичном анализе.

Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают пептид с SEQ ID NO: 337 из N-концевой области человеческого ANGPTL8 с полупериодом диссоциации (t^{1/2}), превышающим примерно 100 мин при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа, или, по существу, аналогичного анализа. В конкретных вариантах осуществления предложены анти-ANGPTL8 антитела, которые связывают пептиды из N-концевой области человеческого ANGPTL8 при 25°C с t^{1/2}, превышающим или равным примерно 110, превышающим примерно 120, превышающим примерно 130, превышающим примерно 200, превышающим примерно 300, превышающим примерно 400, превышающим примерно 500 мин, или более длительным, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, описанного в примере 3 настоящего документа, или, по существу, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые вызывают снижение уровней триглицеридов у млекопитающего на примерно 20, или на примерно 30, или на примерно 40, или на примерно 50, или на примерно 60%, или более, при подкожном введении в дозе примерно 0,1, или примерно 1, или примерно 10, или примерно 25, или примерно 50, или примерно 100 мг/кг. Эффект антитела по изобретению на снижение уровней триглицеридов в плазме может продолжаться по меньшей мере от 7 дней после введения до примерно 3 или 4 недель после введения или дольше.

Антитело по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 226, 242, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314 и 330; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250 и 322; или может перекрестно конкурировать с эталонным антителом, при этом эталонное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) и вариабельной области легкой цепи (LCVR), выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR в табл. 1.

Антитело по изобретению может содержать пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/218, 226/234, 242/250, 258/250, 266/250, 274/250, 282/250, 290/250, 306/250, 314/322 и 330/322.

Антитело по изобретению может содержать:

(a) домен HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 228, 244, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308, 316 и 332;

(b) домен HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 230, 246, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310, 318 и 334;

(c) домен HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 232, 248, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320 и 336;

(d) домен LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 220, 236, 252 и 324;

(e) домен LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 222, 238, 254 и 326; и

(f) домен LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 224, 240, 256 и 328.

Антитела по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеуказанных биологических характеристик, или любым их сочетанием. Вышеприведенный список биологических характеристик антител по изобретению не должен быть исчерпывающим. Другие биологические характеристики антител по настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области из описания настоящего изобретения, включая рабочие примеры, приведенные в настоящем документе.

Картирование эпитопов и соответствующие технологии

Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка ANGPTL8. Альтернативно, эпитоп может состоять из нескольких несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) в ANGPTL8.

Можно использовать различные методы, известные специалистам в данной области, для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или более аминокислотами" в полипептиде или белке. Иллюстративные методы включают, например, рутинный анализ перекрестного блокирования, такой, как описан в сборнике *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY), анализ методом аланин-сканирующего мутагенеза, анализ методом пептидного блоттинга (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463) и анализ методом пептидного расщепления. Кроме того, можно использовать такие методы, как вырезание эпитопов, экстракция эпитопов и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). Другой метод, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которыми взаимодействует антитело, представляет собой метод водородно-дейтериевого обмена, обнаруживаемого с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием интересующего белка, с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, давая возможность происходить водородно-дейтериевому обмену на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются мечеными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, что позволяет обнаруживать меченые дейтерием остатки, соответствующие конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело; смотри, например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A.

Настоящее изобретение также включает анти-ANGPTL8 антитела, которые связывают тот же эпитоп, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 1 настоящего документа). Аналогично, настоящее изобретение также включает анти-ANGPTL8 антитела, которые конкурируют за связывание ANGPTL8 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 1 настоящего документа).

Можно с легкостью определять, связывает ли антитело тот же эпитоп, что и эталонное анти-ANGPTL8 антитело, или конкурирует ли за связывание с эталонным анти-ANGPTL8 антителом, используя рутинные методы, известные в данной области и приведенные в качестве примеров в настоящем документе. Например, для определения того, связывает ли тестируемое антитело тот же эпитоп, что и эталонное анти-ANGPTL8 антитело по изобретению, эталонному антителу дают возможность связывать белок ANGPTL8. Затем оценивают способность тестируемого антитела связывать молекулу ANGPTL8. Если тестируемое антитело способно связывать ANGPTL8 после насыщающего связывания с эталонным анти-ANGPTL8 антителом, то можно сделать вывод о том, что тестируемое антитело связывает иной эпитоп, нежели эталонное анти-ANGPTL8 антитело. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связывать молекулу ANGPTL8 после насыщающего связывания с эталонным анти-ANGPTL8 антителом, значит тестируемое антитело может связывать тот же эпитоп, что и эпитоп, связываемый эталонным анти-ANGPTL8 антителом по изобретению. Затем можно проводить дополнительное рутинное экспериментирование (например, мутацию пептидов и анализы связывания) для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела объясняется связыванием того же эпитопа, что и эпитоп эталонного антитела, или за наблюдаемое отсутствие связывания несет ответственность стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода можно проводить с использованием методов ELISA, RIA, Вiasoge, проточной цитометрии или любых других количественных или качественных анализов связывания антител, доступных в данной области. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения два антитела связывают один и тот же (или перекрывающийся) эпитоп, если, например, одно антитело в 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратном избытке ингибирует связывание другого антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99% при измерении в конкурентном анализе связывания (смотри, например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502). Альтернативно, считают, что два антитела связывают один и тот же эпитоп, если

практически все аминокислотные мутации в антигене, которые приводят к ослаблению или исчезновению связывания одного антитела, приводят к ослаблению или исчезновению связывания другого антитела. Считают, что два антитела имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только некоторая часть аминокислотных мутаций, которые приводят к ослаблению или исчезновению связывания одного антитела, приводит к ослаблению или исчезновению связывания другого антитела.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным анти-ANGPTL8 антителом, вышеописанную методологию определения связывания применяют в двух ориентациях: в первой ориентации эталонному антителу дают возможность связывать белок ANGPTL8 в условиях насыщения, с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой ANGPTL8. Во второй ориентации тестируемому антителу дают возможность связывать молекулу ANGPTL8 в условиях насыщения, с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой ANGPTL8. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связывать молекулу ANGPTL8, делают вывод о том, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание ANGPTL8. Как понимают специалисты в данной области, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может не обязательно связывать тот же эпитоп, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение человеческих антител.

Анти-ANGPTL8 антитела по настоящему изобретению могут представлять собой полностью человеческие (не существующие в природе) антитела. Методы получения моноклональных антител, включая полностью человеческие моноклональные антитела, известны в данной области. Любой из таких известных методов можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связывают человеческий ANGPTL8.

С использованием технологии VELOCIMMUNE® (смотри, например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного метода получения моноклональных антител сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к аллергену, имеющие переменную область человеческого антитела и константную область мышинового антитела. Технология VELOCIMMUNE® включает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий гены переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мышинового антитела так, что в организме мыши в ответ на стимуляцию антигеном продуцируется антитело, содержащее переменную область человеческого антитела и константную область мышинового антитела. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепей человеческого антитела. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Как правило, мышь VELOCIMMUNE® иммунизируют интересующим антигеном и лимфатические клетки (такие как В-клетки) извлекают из мыши, в организме которой экспрессируются антитела. Можно проводить слияние лимфатических клеток с клетками миеломы, получая линии immortalized клеток гибридом, и проводить скрининг и отбор таких линий клеток гибридом для идентификации линий клеток гибридом, продуцирующих антитела, специфичные для интересующего антигена. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно выделять и связывать с константными областями нужного изотипа тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть получен в клетке, такой как клетка CHO. Альтернативно, ДНК, кодирующую антиген-специфические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антиген-специфических лимфоцитов.

Как описано в "Экспериментальной части" настоящего документа, выделенные высокоаффинные химерные антитела, имеющие переменную область человеческого антитела и константную область мышинового антитела, характеризуют и проводят отбор на наличие желательных характеристик, включая аффинность, избирательность, эпитоп и так далее. Константные области мышинового антитела затем заменяют нужной константной областью человеческого антитела, получая полностью человеческое антитело по изобретению, например, дикого типа, или модифицированное, IgG1 или IgG4. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокой аффинности связывания антигена и специфичности в отношении мишени определяются переменной областью.

В целом, антитела по настоящему изобретению обладают очень высокой аффинностью, как правило, имея величину K_D от примерно 10^{-12} М до примерно 10^{-9} М при измерении характеристик связывания с антигеном, либо иммобилизованным на твердой фазе, либо находящимся в растворе.

Биоэквиваленты.

Анти-ANGPTL8 антитела и фрагменты антител, по настоящему изобретению включают белки, которые имеют аминокислотные последовательности, отличающиеся от последовательностей описанных антител, однако сохраняют способность связывать человеческий ANGPTL8. Такие варианты антитела

и фрагменты антител имеют одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот в сравнении с исходной последовательностью, однако обладают биологической активностью, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Аналогично, кодирующие анти-ANGPTL8 антитело последовательности ДНК по настоящему изобретению включают последовательности, которые имеют одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов в сравнении с раскрытой последовательностью, но кодируют анти-ANGPTL8 антитело, или фрагмент антитела, которое практически биоэквивалентно анти-ANGPTL8 антителу, или фрагменту антитела, по изобретению. Примеры таких вариантных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей обсуждаются выше.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых существенно не отличаются при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, в виде либо однократной дозы, либо нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени их абсорбции, но не по скорости их абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентами, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются намеренными, и это отражено в маркировке, не являются существенными для достижения эффективной концентрации лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и с медицинской точки зрения считаются несущественными для конкретного изучаемого лекарственного продукта.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствуют клинически значимые отличия в их безопасности, чистоте и эффективности.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биологически эквивалентными, если пациент может переключаться один или более раз с использования эталонного продукта на использование биологического продукта без ожидаемого возрастания риска неблагоприятных эффектов, включая клинически значимое изменение в иммуногенности или снижение эффективности, по сравнению с продолжающимся лечением без такого переключения.

В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для конкретного состояния или состояний, в той степени, насколько эти механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована *in vivo* и *in vitro* методами. Определение биоэквивалентности включает, например, (a) *in vivo* тест для человека или других млекопитающих, в котором измеряют концентрацию антитела или его метаболитов в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости с течением времени; (b) *in vitro* тест, который коррелирует, и в разумной степени способен прогнозировать данные по биодоступности у человека *in vivo*; (c) *in vivo* тест для человека или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют с течением времени; и (d) надлежащим образом контролируемое клиническое испытание, позволяющее устанавливать безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты анти-ANGPTL8 антител по изобретению могут быть сконструированы, например, путем осуществления различных замен остатков или последовательностей либо делеций концевых, или внутренних, остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не важные для биологической активности, могут быть делетированы или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостов при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты анти-ANGPTL8 антител, имеющие аминокислотные изменения, которые приводят к изменению характеристик гликозилирования антител, например мутации, которые приводят к элиминации или устранению гликозилирования.

Мультиспецифические антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида; смотри, например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244. Анти-ANGPTL8 антитела по настоящему изобретению могут быть связаны или совместно экспрессированы с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент, может быть функционально связано (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более другими молекулярными фрагментами, такими как другое антитело, или фрагмент антитела, с получением биспецифического или мультиспецифического антитела со второй специфичностью связывания.

Настоящее изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий ANGPTL8, а другое плечо иммуноглобулина специфично для второго антигена. ANGPTL8-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, приведенных в табл. 1 настоящего документа.

Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает использование первого C_H3-домена иммуноглобулина (Ig) и второго C_H3-домена Ig, при этом первый и второй C_H3-домены Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой и при этом по меньшей мере одно аминокислотное отличие приводит к ослаблению связывания биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, у которого отсутствует аминокислотное отличие. В одном варианте осуществления первый C_H3-домен Ig связывает белок А и второй C_H3-домен Ig содержит мутацию, которая приводит к ослаблению или ликвидации связывания белка А, например модификацию Н95R (согласно нумерации экзонов IMGT; Н435R согласно нумерации ЕС). Второй C_H3-домен может дополнительно иметь модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно ЕС). Дополнительные модификации, которые могут иметь место во втором C_H3-домене, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно ЕС) в случае IgG1 антител; N44S, K52N и V82I (согласно IMGT; N384S, K392N и V422I согласно ЕС) в случае IgG2 антител; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно ЕС) в случае IgG4 антител. Подразумевается, что вариации формата биспецифического антитела, описанные выше, входят в объем настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диатела, слитые продукты IgG-scFv, Ig с двойным вариабельным доменом (DVD), квадromы, структуры типа "выступ-во-впадину", общие легкие цепи (например, общие легкие цепи со структурой типа "выступ-во-впадину", и так далее), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, "лейциновые застёжки", DuoBody®, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (смотри, например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и приведенные в этой публикации ссылки для получения информации о вышеуказанных форматах). Биспецифические антитела также могут быть сконструированы с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, когда неприродные аминокислоты с независимой химической реакционной способностью используют для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самособираются в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрической формой (смотри, например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтический препарат и введение.

Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим анти-ANGPTL8 антитела, или их антигенсвязывающие фрагменты, по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по изобретению формулируют с соответствующими носителями, эксципиентами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, толерантность и тому подобное. Множество соответствующих препаратов можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти препараты включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как липофектин™, Life Technologies, Carlsbad, CA), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с разными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс; смотри также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и массы тела пациента, подвергаемого лечению заболевания, условий, пути введения и тому подобного. Предпочтительную дозу, как правило, рассчитывают, исходя из массы тела или площади поверхности тела. Для взрослых пациентов может быть предпочтительным внутривенное введение антитела по настоящему изобретению, как правило, в одной дозе, составляющей от примерно 0,01 до примерно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от примерно 0,02 до примерно 7, от примерно 0,03 до примерно 5 или от примерно 0,05 до примерно 3 мг/кг массы тела. В зависимости от степени тяжести состояния частоту и продолжительность лечения можно корректировать. Эффективные дозы и схемы введения анти-ANGPTL8 антител можно определять эмпирически; например достигнутый пациентом прогресс можно контролировать путем периодической оценки, и соответственно корректировать дозы. Кроме того, можно выполнять межвидовое масштабирование доз методами, хорошо известными в данной области (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Различные системы доставки известны и могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по изобретению, например инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредуемый рецепторами эндцитоз (смотри, например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный способы введения. Композицию можно вводить любым удобным путем введения, например инфузией или болюсной инъекцией, абсорбцией через эпители-

альную или слизисто-кожную выстилку (например, через слизистую оболочку ротовой полости, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и так далее) и можно вводить совместно с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или локальным.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно доставлять подкожно или внутривенно при помощи стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно использовать шприц-ручку. Такая шприц-ручка может быть устройством многоразового или одноразового использования. В шприц-ручке многоразового использования, как правило, имеется сменный картридж, содержащий фармацевтическую композицию. После того как находящаяся в картридже фармацевтическая композиция полностью использована и картридж становится пустым, пустой картридж можно выбрасывать и заменять новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого шприц-ручку можно повторно использовать. В шприц-ручке одноразового использования нет сменного картриджа. Шприц-ручка одноразового использования бывает предварительно заполнена фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре внутри устройства. После использования всей находящейся в резервуаре фармацевтической композиции все устройство выбрасывают.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут быть использованы различные шприц-ручки многоразового использования и автоинжекторные устройства доставки. Примеры включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany) и многие другие. Примеры шприц-ручек одноразового использования, подходящих для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL), а также многие другие.

В некоторых ситуациях фармацевтическую композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос (смотри Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы; смотри Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте осуществления систему с контролируемым высвобождением можно помещать в непосредственной близости от мишени для действия композиции, таким образом потребуется лишь часть системной дозы (смотри, например, Goodson, 1984, в Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, p. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и так далее. Такие инъекционные препараты можно получать общеизвестными методами. В качестве примера инъекционные препараты можно получать, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела, или его соли, описанного выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства, и так далее, которые можно использовать в сочетании с соответствующим солюбилизирующим средством, таким как спирт (например, этанол), многоатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионный сурфактант [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 мол.) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и так далее. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и так далее, которые можно использовать в сочетании с солюбилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и так далее. Полученный таким образом инъекционный препарат предпочтительно разливают в соответствующие ампулы.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального введения, описанные выше, готовят в стандартных лекарственных формах, содержащих дозу активных ингредиентов. Такие стандартные лекарственные формы включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и так далее. Количество вышеуказанного антитела, заключающееся в стандартной лекарственной форме, как правило, составляет от примерно 5 до примерно 500 мг на стандартную лекарственную форму; в частности, предпочтительно, если в форме инъекции вышеуказанное антитело содержится в дозе от примерно 5 до примерно 100 мг, и в дозе от примерно 10 до примерно 250 мг в других лекарственных формах.

Иммуноконъюгаты.

Изобретение также относится к человеческому анти-ANGPTL8 моноклональному антителу, конъюгированному с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как средство, способное вызывать снижение уровней триглицеридов или уровней липидов в крови. При выборе вида терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с анти-ANGPTL8 антителом, следует учитывать состояние, подлежащее лечению, и терапевтический эффект, который желательно достичь. Например, для лечения гипертриглицеридемии или любого другого состояния, при котором желательно снижать уровни триглицеридов в крови и/или поддерживать нормальные уровни триглицеридов в крови, соответствующее средство можно конъюгировать с анти-ANGPTL8 антителом. Альтернативно, если желательный терапевтический эффект заключается в лечении осложнений или симптомов, ассоциированных с гипертриглицеридемией, или любым другим состоянием, возникающим вследствие высоких или неконтролируемых уровней триглицеридов в крови, может быть предпочтительной конъюгация средства, подходящего для лечения осложнений или симптомов состояния. Примеры соответствующих средств для получения иммуноконъюгатов известны в данной области, смотри, например, WO 05/103081.

Терапевтическое применение антител.

Настоящие антитела полезны для снижения уровней триглицеридов в крови, например, у пациента, страдающего гипертриглицеридемией, а также для лечения широкого спектра состояний и заболеваний, при которых полезно ингибирование активности ANGPTL8. Таким образом, антитела можно использовать, например, для предотвращения, лечения или ослабления заболеваний или состояний либо ассоциированных симптомов или осложнений эндокринной системы, центральной нервной системы, периферической нервной системы, сердечно-сосудистой системы, легочной системы и пищеварительной системы, в то же время уменьшая или устраняя один или более из нежелательных побочных эффектов, связанных с современными методами лечения.

Например, антитела по изобретению можно использовать для лечения заболевания или нарушения, включая, но без ограничения, те, которые связаны с метаболизмом липидов, такие как гиперлипидемия, гиперлипопротеинемия и дислипидемия, включая атерогенную дислипидемию, диабетическую дислипидемию, гипертриглицеридемию, включая тяжелую гипертриглицеридемию с уровнем ТГ >1000 мг/дл и сопутствующим острым панкреатитом, гиперхолестеринемия, хиломикронемия, смешанная дислипидемия (ожирение, метаболический синдром, диабет и так далее), липодистрофия, липоатрофия и тому подобное, которые вызываются, например, снижением активности ЛПЛ и/или дефицитом ЛПЛ, изменением ApoC2, дефицитом ApoE, увеличением уровней ApoB, увеличением продуцирования и/или уменьшением элиминации липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), лечением некоторыми лекарственными средствами (например, вызываемая лечением глюкокортикоидами дислипидемия), любой генетической предрасположенностью, диетой, образом жизни и тому подобным.

Способы по изобретению также позволяют предотвращать или лечить заболевания или нарушения, связанные с, или вызываемые, триглицеридемией, гипертриглицеридемией, гиперлипидемией, гиперлипопротеинемией и/или дислипидемией, включая, но без ограничения, сердечно-сосудистые заболевания или нарушения, такие как атеросклероз, аневризма, гипертензия, стенокардия, инсульт, цереброваскулярные заболевания, застойная сердечная недостаточность, болезни коронарных артерий, инфаркт миокарда, болезни периферических сосудов и тому подобное; острый панкреатит; неалкогольный стеатогепатит (НАСГ); нарушение содержания сахара в крови, такое как диабет (например, диабет II типа); ожирение и тому подобное.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одно антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать для лечения ассоциированных с метаболическим синдромом дислипидемии, ожирения, или для предотвращения увеличения массы тела, или для поддержания нормальной массы тела.

В одном варианте осуществления изобретение относится к способу снижения уровней триглицеридов в крови, либо лечения состояния или заболевания, связанного с, или частично характеризующегося, повышенными уровнями триглицеридов в крови, или по меньшей мере одного симптома или осложнения, ассоциированного с состоянием или заболеванием, который включает введение фармацевтической композиции, содержащей одно или более антител, специфичных для человеческого ANGPTL8, из табл. 1, пациенту, который нуждается в этом, в результате чего уровни триглицеридов снижаются, либо состояние или заболевание ослабляется, либо по меньшей мере один симптом или осложнение, ассоциированное с состоянием или заболеванием, облегчается или степень его тяжести уменьшается.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению можно использовать отдельно или в сочетании с вторым или третьим терапевтическим средством для лечения гипертриглицеридемии, либо по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с гипертриглицеридемией, или можно использовать для лечения пациента, имеющего риск развития гипертриглицеридемии, например пациента, имеющего генетическую предрасположенность к развитию гипертриглицеридемии, например семейной гипертриглицеридемии, или семейной дисбеталипопротеинемии.

Другие состояния могут предрасполагать пациента к повышению уровней триглицеридов. Напри-

мер, некоторые лекарственные препараты, такие как бета-блокаторы, пилюли для контрацепции, диуретики, стероиды, либо использование тамоксифена, могут приводить к повышению уровней триглицеридов и, следовательно, могут повышать вероятность того, что у пациента разовьются состояния или осложнения, связанные с высокими уровнями триглицеридов, такие как атеросклероз, инсульт, сердечный приступ и другие кардиологические состояния.

Кроме того, некоторые другие состояния могут приводить к повышению уровней триглицеридов, включая ожирение, плохо контролируемый диабет, гипотиреоз, заболевание почек или употребление спиртных напитков.

В одном варианте осуществления антитела могут быть использованы для предотвращения начала заболевания или нарушения, частично характеризующегося повышенными уровнями триглицеридов в крови, или для предотвращения вероятности развития такого заболевания или нарушения, или для снижения степени тяжести заболевания или нарушения, либо по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением. Предполагается, что антитела по изобретению могут быть использованы отдельно либо в качестве вспомогательной терапии с другими средствами или способами, известными в качестве стандарта оказания медицинской помощи пациентам, страдающим заболеваниями или состояниями, частично характеризующимися повышенными уровнями триглицеридов в крови, такими как, но без ограничения, гипертриглицеридемия. Такая стандартная терапия может включать введение жидкости или введение любых других фармацевтических средств, полезных для снижения в крови уровней триглицеридов или липидов, или для снижения массы тела.

В одном варианте осуществления применение антител, описанных в настоящем документе, может быть эффективным средством для достижения нормальных уровней триглицеридов и, как следствие, ослабления, или предотвращения, одного или более симптомов, либо долгосрочных осложнений, ассоциированных с заболеванием, характеризующимся высокими уровнями триглицеридов.

Предусмотрено, что антитела по изобретению могут быть использованы в экстренных случаях (для краткосрочного использования) или для долгосрочного использования (в качестве постоянной терапии).

Комбинированная терапия.

Комбинированная терапия может включать использование анти-ANGPTL8 антитела по изобретению и любого дополнительного терапевтического средства, которое может быть полезно сочетать с антителом по изобретению, или с биологически активным фрагментом антитела по изобретению.

Например, когда антитела по изобретению предполагается использовать для лечения заболевания или состояния, частично характеризующегося повышенными уровнями триглицеридов, такого как гипертриглицеридемия, может быть использовано второе терапевтическое средство, способствующее дополнительному снижению уровней триглицеридов или ослаблению по меньшей мере одного симптома у пациента, страдающего заболеванием или состоянием, характеризующимся высокими уровнями триглицеридов в крови. Такое второе средство можно выбирать, например, из другого антагониста ANGPTL8 (например, другого анти-ANGPTL8 антитела или низкомолекулярного ингибитора ANGPTL8) или можно использовать другие терапевтические средства, полезные для лечения триглицеридемии, либо других заболеваний или состояний, связанных с, или вызываемых повышенными уровнями триглицеридов в крови, или средства, полезные для лечения любых долгосрочных осложнений, связанных с повышенными и/или неконтролируемыми уровнями триглицеридов в крови.

В связанных вариантах осуществления изобретение относится к композиции, которая представляет собой сочетание антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению и второго терапевтического средства, такого как (1) ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А (HMG-CoA) редуктазы, такие как церивастатин, аторвастатин, симвастатин, питавастатин, розувастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин и тому подобное; (2) ингибиторы поглощения холестерина и/или повторного поглощения желчных кислот; (3) ниацин, способствующий усилению катаболизма липопротеинов; (4) фибраты или амфипатические карбоновые кислоты, вызывающие снижение уровней липопротеинов низкой плотности (ЛНП), оптимизацию уровней липопротеинов высокой плотности (ЛВП) и уровней ТГ, и приводящие к сокращению числа не смертельных сердечных приступов; и (5) активаторы фактора транскрипции LXR, который участвует в элиминации холестерина, такого как 22-гидроксихолестерин, или фиксированные комбинации, такие как эзетимиб плюс симвастатин; статин с секвестрантом желчных кислот (например, холестирамин, колестипол, колесевилам), фиксированная комбинация ниацин плюс статин (например, ниацин с ловастатином); или другие снижающие уровень липидов средства, такие как этиловые эфиры омега-3-жирных кислот (например, омакор).

Кроме того, второе терапевтическое средство может представлять собой один или более других ингибиторов/антагонистов глюкагона или ингибиторов/антагонистов рецепторов глюкагона, а также ингибиторы других молекул, такие как другие ингибиторы ANGPTL8, а также ингибиторы других молекул, таких как ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6, аполипопротеин С-III (также называемые АРОС3; смотри, например, ингибиторы АРОС3, описанные в US8530439, US7750141, US7598227, и во-лансорсен, также называемый ISIS-АРОСIII_{Rx}) и пробелок гомеостаз холестерина и/или триглицеридов. Ингибиторы этих молекул включают малые молекулы, бессмысловые молекулы и антитела, ко-

торые специфически связывают эти молекулы и блокируют их активность.

В одном варианте осуществления, если анти-ANGPTL8 антитела по изобретению используют для лечения такого заболевания, как диабет (например, диабет 2 типа), то эти антитела можно использовать в сочетании с одним или более из следующих антидиабетических терапевтических средств, которые доступны в настоящее время. К ним относятся инсулин, аналог инсулина (смотри ниже), бигуанид (метформин), сульфонилмочевина (например, глибурид, глипизид), агонист рецепторов PPAR-гамма (например, пиоглитазон, розиглитазон), ингибитор альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, воглибоз), агонист рецепторов глюкагонподобного пептида 1 (GLP-1) (например, баета® (эксенатид), трулисити™ (дулаглутид), виктоза® (лираглутид), ликсумия® (ликсисенатид), танзеум™ (албиглутид), или аналог любого из вышеперечисленных), ингибитор дипептидилпептидазы IV (DPP-4) (например, саксаглиптин (онглиза®), ситалиптин (янувия®) и вилдаглиптин (галвус®), ингибитор натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2) (например, инвокана™ (канаглифлозин), форксига® (дапаглифлозин), эмпаглифлозин, ипраглифлозин, тофоглифлозин), симлин® (прамлингид), антагонист рецепторов глюкагона (описанный, например, в US8545847) и антагонист глюкагона.

В некоторых связанных вариантах осуществления композиция может содержать второе средство, выбранное из группы, состоящей из несульфонилмочевинных секретагогов, аналогов инсулина, включая аналоги быстрого действия (например, лиспро, аспарт, глулизин) и длительного действия (например, инсулин детемир, инсулин деглудек или инсулин гларгин), полипептидов эксендина-4, агонистов бета-3 адренорецепторов, ингибиторов поглощения холестерина и/или повторного поглощения желчных кислот, антагонистов ЛНП-холестерина, антагонистов белка-переносчика холестерина эфиров (например, торцетрапиб, анацетрапиб, далцетрапиб или эвацетрапиб), антагонистов рецепторов эндотелина, антагонистов гормона роста, сенсibilизаторов инсулина, миметиков или агонистов амилина, антагонистов каннабиноидных рецепторов, агонистов рецепторов глюкагонподобного пептида 1, меланокортинов, агонистов рецепторов меланинконцентрирующего гормона, СИОЗСН, миметика фактора роста фибробластов 21 (FGF21) (смотри, например, US20110002845 и US20080261236), агониста рецепторов 1с фактора роста фибробластов (FGFR1с) (смотри, например, US20110150901), ингибитора образования конечного продукта усиленного гликозилирования, такого как, но без ограничения, аминугуанидин, и ингибиторов протеин-тирозин фосфатазы.

В связанных вариантах осуществления второе терапевтическое средство может представлять собой одно или более других терапевтических средств, таких как анальгетики, противовоспалительные средства, включая нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВС), такие как ингибиторы Cox-2 и тому подобное, для облегчения и/или уменьшения симптомов, сопутствующих основному состоянию, при необходимости.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить до, одновременно с, или после введения анти-ANGPTL8 антитела по настоящему изобретению. Для целей настоящего изобретения такие схемы введения рассматривают, как введение анти-ANGPTL8 антитела "в сочетании с" вторым терапевтически активным компонентом.

Схемы введения.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения несколько доз анти-ANGPTL8 антитела (или фармацевтической композиции, содержащей сочетание анти-ANGPTL8 антитела и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с данным аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз анти-ANGPTL8 антитела по изобретению. При использовании в настоящем документе "последовательное введение" означает, что каждую дозу анти-ANGPTL8 антитела вводят субъекту в отдельный момент времени, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, несколько часов, дней, недель или месяцев). По настоящему изобретению предусмотрены способы, включающие последовательное введение пациенту одной начальной дозы анти-ANGPTL8 антитела с последующими одной или более вторичными дозами анти-ANGPTL8 антитела и, необязательно, с последующими одной или более третичными дозами анти-ANGPTL8 антитела.

Термины "начальная доза" "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения анти-ANGPTL8 антитела по изобретению. Так, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (ее также называют "исходной дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут содержать одно и то же количество анти-ANGPTL8 антитела, но, как правило, могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако в конкретных вариантах осуществления количество анти-ANGPTL8 антитела, содержащееся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, отличается (например, скорректировано в сторону увеличения или уменьшения, в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В конкретных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения в качестве "нагрузочных доз", за которыми следуют дозы, вводимые менее часто (например,

"поддерживающие дозы").

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Используемое в настоящем документе выражение "непосредственно предшествующая доза" означает, в последовательности из нескольких введений, дозу анти-ANGPTL8 антитела, которую вводят пациенту перед введением следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы по данному аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз анти-ANGPTL8 антитела. Например, в конкретных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в конкретных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз. Режим введения можно соблюдать бесконечно на всем протяжении жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение не перестанет быть терапевтически необходимым или полезным.

В вариантах осуществления, включающих использование нескольких вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с такой же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих использование нескольких третичных доз, каждую третичную дозу можно вводить с такой же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В конкретных вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может варьироваться на протяжении курса лечения. Частоту введения на протяжении курса лечения также может корректировать врач в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

Диагностическое применение антител.

Анти-ANGPTL8 антитела по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения количества ANGPTL8 в образце, например, для диагностических целей. Например, анти-ANGPTL8 антитело или его фрагмент, можно использовать для диагностирования состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и так далее) ANGPTL8. Иллюстративные диагностические анализы для ANGPTL8 могут включать, например, создание контакта образца, полученного от пациента, с анти-ANGPTL8 антителом по изобретению, при этом анти-ANGPTL8 антитело метят детектируемой меткой или репортерной молекулой, либо используют в качестве улавливающего лиганда для избирательного выделения белка ANGPTL8 из образцов пациентов. Альтернативно, меченое анти-ANGPTL8 антитело можно использовать в диагностических вариантах применения в сочетании с вторичным антителом, которое мечено детектируемой меткой. Детектируемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S или ¹²⁵I; флуоресцентную или хемилюминесцентную молекулу, такую как флуоресцеин изотиоцианат или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза.

Конкретные иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения ANGPTL8 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) и активированную флуоресценцией сортировку клеток (FACS).

Образцы, которые могут быть использованы в диагностических анализах ANGPTL8 в соответствии с настоящим изобретением, включают любую ткань или жидкий образец, получаемый от пациента, содержащий поддающиеся обнаружению количества белка ANGPTL8, или его фрагментов, в норме или при патологии. Как правило, уровни ANGPTL8 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью ANGPTL8), будут измерены для начального установления базового, или стандартного, уровня ANGPTL8. Этот базовый уровень ANGPTL8 затем можно сравнить с уровнями ANGPTL8, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, предположительно имеющих связанное с ANGPTL8 заболевание или состояние, либо симптомы, ассоциированные с таким заболеванием или состоянием.

Примеры

Прежде, чем перейти к описанию настоящих методов, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными методами и экспериментальными условиями, поскольку такие методы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, служит исключительно для описания конкретных вариантов осуществления и не должна быть ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен лишь прилагаемой формулой изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых зна-

чений (например, количеств, температуры и так далее), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если нет иных указаний, все части являются частями по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия и давление соответствует, или примерно соответствует, атмосферному.

Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится данное изобретение. В настоящем документе термин "примерно" при использовании применительно к конкретной приведенной числовой величине означает, что величина может отличаться от приведенной величины не более чем на 1%. Например, используемое в настоящем документе выражение "примерно 100" включает 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и так далее).

Хотя любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, предпочтительные методы и материалы описаны далее. Все публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Пример 1. Получение анти-ANGPTL8 антител.

Анти-ANGPTL8 антитела получали путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (то есть генетически модифицированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой цепи и легкой цепи каппа человеческого иммуноглобулина) иммуногеном, представляющим собой рекомбинантный человеческий ANGPTL8, экспрессированный с С-концевым маркером IgG2a мыши (смотри SEQ ID NO: 340). Иммунный ответ в виде продуцирования антител контролировали с помощью ANGPTL8-специфического иммуноанализа. После достижения желательного иммунного ответа несколько полностью человеческих анти-ANGPTL8 антител были получены из антиген-положительных В-клеток, как описано в патенте US 2007/0280945A1, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Некоторые биологические свойства иллюстративных анти-ANGPTL8 антител, полученных способами, описанными в данном примере, описаны подробно в приведенных далее примерах.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей.

В табл. 1 приведены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей, а также CDR, тяжелых и легких цепей отдельных анти-ANGPTL8 антител по изобретению. Идентификаторы соответствующих нуклеотидных последовательностей приведены в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

SEQ ID Nos :								
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N15314P2	2	4	6	8	10	12	14	16
H4N15316P	18	20	22	24	26	28	30	32
H4N15318P	34	36	38	40	42	44	46	48
H4N15319P	50	52	54	56	58	60	62	64
H4N15321P	66	68	70	72	74	76	78	80
H4N15323P	82	84	86	88	90	92	94	96
H4N15330P	98	100	102	104	106	108	110	112
H4N15331P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4N15334P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4N15335P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4N15341P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4N15343P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4N15345P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4N15346P	210	212	214	216	218	220	222	224
H4N15347P	226	228	230	232	234	236	238	240
H4N15350P2	242	244	246	248	250	252	254	256
H4N15353P2	258	260	262	264	250	252	254	256
H4N15354P2	266	268	270	272	250	252	254	256
H4N15355P2	274	276	278	280	250	252	254	256
H4N15357P2	282	284	286	288	250	252	254	256
H4N15361P2	290	292	294	296	250	252	254	256
H4N15362P2	298	300	302	304	250	252	254	256
H4N15363P2	306	308	310	312	250	252	254	256
H4N15367P2	314	316	318	320	322	324	326	328
H4N15369P2	330	332	334	336	322	324	326	328

Таблица 2

Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

SEQ ID Nos :								
Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N15314P2	1	3	5	7	9	11	13	15
H4N15316P	17	19	21	23	25	27	29	31
H4N15318P	33	35	37	39	41	43	45	47
H4N15319P	49	51	53	55	57	59	61	63
H4N15321P	65	67	69	71	73	75	77	79
H4N15323P	81	83	85	87	89	91	93	95
H4N15330P	97	99	101	103	105	107	109	111
H4N15331P	113	115	117	119	121	123	125	127
H4N15334P	129	131	133	135	137	139	141	143
H4N15335P	145	147	149	151	153	155	157	159
H4N15341P	161	163	165	167	169	171	173	175
H4N15343P	177	179	181	183	185	187	189	191

H4H15345P	193	195	197	199	201	203	205	207
H4H15346P	209	211	213	215	217	219	221	223
H4H15347P	225	227	229	231	233	235	237	239
H4H15350P2	241	243	245	247	249	251	253	255
H4H15353P2	257	259	261	263	249	251	253	255
H4H15354P2	265	267	269	271	249	251	253	255
H4H15355P2	273	275	277	279	249	251	253	255
H4H15357P2	281	283	285	287	249	251	253	255
H4H15361P2	289	291	293	295	249	251	253	255
H4H15362P2	297	299	301	303	249	251	253	255
H4H15363P2	305	307	309	311	249	251	253	255
H4H15367P2	313	315	317	319	321	323	325	327
H4H15369P2	329	331	333	335	321	323	325	327

В настоящем документе антитела, как правило, обозначены в соответствии со следующей номенклатурой: префикс Fc (например, "H1H", "H1M", "H2M", "H4H" и так далее), затем следует числовой идентификатор (например, "15321", "15341", "15350" и так далее), затем следует суффикс "P" или "N", как показано в табл. 1 и 2. Таким образом, в соответствии с данной номенклатурой антитело в настоящем документе может быть обозначено, например, "H4H15321P" и так далее. Префикс H4H в обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывает на конкретный изотип Fc-области антитела. Например, антитело "H4H" имеет Fc человеческого IgG4, антитело "H1M" имеет Fc мышинового IgG1 и антитело "H2M" имеет Fc мышинового IgG2 (все переменные области являются полностью человеческими, на что указывает первая буква "H" в обозначении антител). Специалист в данной области понимает, что антитело, имеющее Fc конкретного изотипа, может быть преобразовано в антитело с Fc другого изотипа (например, антитело с Fc мышинового IgG1 может быть преобразовано в антитело с Fc человеческого IgG4, и так далее), однако в любом случае переменные домены (включая области CDR), на которые указывают числовые идентификаторы, приведенные в табл. 1 и 2, будут оставаться теми же самыми, и ожидается, что связывающая способность будет идентичной, или, по существу, аналогичной, независимо от природы Fc-домена.

Пример 3. Определение методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) констант скорости диссоциации (k_d) для связывания анти-ANGPTL8 антител с пептидами ANGPTL8, ANGPTL3 и ANGPTL4.

Ранее было показано, что связывание антител с N-концевой биспиральной областью ANGPTL3 [WO 2012/174178 A1; Lee et al. (2009) JBC, 284:13735-13745] и ANGPTL4 [Desai et al. (2007) PNAS, 104:11766-11771] блокирует ЛПЛ-ингибирующую активность белков ANGPTL. В данном эксперименте антитела против ANGPTL8 тестировали на связывание с пептидом из N-концевой области ANGPTL8.

Константы скорости диссоциации для связывания анти-ANGPTL8 антител с пептидом человеческого ANGPTL8 (пептид ч-ANGPTL8, SEQ ID NO: 337) определяли методом поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием биосенсорной платформы MASS-1. В анализе использовали формат, в котором анти-ANGPTL8 антитела были захвачены на поверхности сенсора и пептиды инжектировали над поверхностью с антителами. Пептиды из N-концевой биспиральной области человеческого ANGPTL3 (пептид ч-ANGPTL3, SEQ ID NO: 338) и человеческого ANGPTL4 (пептид ч-ANGPTL4, SEQ ID NO: 339) также включали в качестве контролей. Также включали контрольное антитело (H4H2 68P из US2011/0159015A1), которое связывает пептид ANGPTL4 и контрольное по изотипу антитело в качестве отрицательного контроля. Все исследования связывания проводили в буфере 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05 об.% сурфактанта Tween-20 (подвижный буфер HBS-ET) при 25°C. Поверхность HCA сенсора дериватизировали за счет связывания через аминокислотные моноклонального мышинового антитела против Fc человека (GE, # BR-1008-39), и на этой поверхности было захвачено примерно 1000 ЕО каждого анти-ANGPTL8 антитела или контрольного антитела. Маточные растворы пептидов разбавляли в подвижном буфере HBS-ET до 500 нМ и инжектировали над покрытиями антителами поверхностями в течение 4 мин при скорости потока 30 мкл/мин, с последующей диссоциацией связанного пептида в подвижном буфере HBS-ET в течение 10 мин.

Фазу ассоциации связывания пептидов с иммобилизованными анти-ANGPTL8 антителами не удалось подогнать к модели связывания 1:1; вследствие этого, только значения константы скорости диссоциации (k_d) были рассчитаны путем подгонки сенсограмм связывания в реальном времени с использованием программы для подбора кривых Scrubber 2.0с. Значения полупериода диссоциации ($t^{1/2}$) рассчитывали на основании k_d следующим образом:

$$t^{1/2} \text{ (мин)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Параметры связывания пептидов N-концевой области ANGPTL8, ANGPTL3 и ANGPTL4 с иммобилизованными анти-ANGPTL8 антителами, контрольным анти-ANGPTL4 антителом и контрольным по изотипу антителом приведены в табл. 3-5.

Результаты.

В данных экспериментальных условиях максимальный сигнал неспецифического связывания, наблюдаемый при связывании 500 нМ пептидов ч-ANGPTL8, ч-ANGPTL3 или ч-ANGPTL4 с пустой анти-ч-Fc поверхностью составлял 3 ЕО. Вследствие этого, взаимодействия связывания с сигналами, в три раза превышающими 3 ЕО неспецифического фона (то есть ≥ 9 ЕО), считали специфическими взаимодействиями связывания. На основании этого критерия сигналы связывания антитело-пептид менее 9 ЕО не считали сигналами связывания (н/с в табл. 1).

Результаты этого изучения связывания показали, что анти-ANGPTL8 антитела H4N15321P, H4N15367P2 и H4N15345P специфически связывают N-концевую область пептида ANGPTL8 (SEQ ID NO: 337). Ни одно из этих анти-ANGPTL8 антител не связывало пептиды N-концевой области ч-ANGPTL3 (SEQ ID NO: 338) или ч-ANGPTL4 (SEQ ID NO: 339).

Таблица 3

Связывание анти-ANGPTL8 моноклональных антител с пептидом ч-ANGPTL8 при 25°C

Захваченное мАт	Уровень захвата мАт (ЕО) *	Связанный 500 нМ пептид чANGPTL8 (ЕО)	kd (1/с)	t _{1/2} (мин)
H4N15321P	1101 ± 6,1	61	8,29E-05	139
H4N15367P2	1116 ± 17,4	43	9,82E-05	118
H4N15345P	1096 ± 3,6	37	2,03E-05	570
H4N15361P2	1394 ± 12,3	4	н/с	н/с
H4N15347P	1554 ± 54,6	0	н/с	н/с
H4N15318P	1087 ± 31,5	0	н/с	н/с
H4N15350P2	1298 ± 30,7	0	н/с	н/с
H4N15363P2	1281 ± 13,7	0	н/с	н/с
H4N15346P	1277 ± 26,3	0	н/с	н/с
H4N15334P	1256 ± 5,3	0	н/с	н/с
H4N15335P	1625 ± 31	0	н/с	н/с
H4N15343P	1129 ± 19,8	0	н/с	н/с
H4N15357P2	1159 ± 13,1	0	н/с	н/с
H4N15353P2	1296 ± 8,5	0	н/с	н/с
H4N15341P	1023 ± 30,1	0	н/с	н/с
H4N15369P2	1196 ± 54,2	0	н/с	н/с
H4N15330P	1168 ± 20,1	0	н/с	н/с
H4N15362P2	1131 ± 15,5	0	н/с	н/с
H4N15319P	974 ± 3,5	0	н/с	н/с
H4N15316P	1107 ± 24,7	0	н/с	н/с
H4N15323P	1068 ± 16,4	0	н/с	н/с
H4N15354P2	1297 ± 8,5	0	н/с	н/с
H4N15355P2	1323 ± 25,4	0	н/с	н/с
H4N15314P2	1011 ± 3,4	0	н/с	н/с
H4N15331P	1264 ± 16,8	-1	н/с	н/с
(α-ANGPTL4 Ат)	1281 ± 50,2	0	н/с	н/с
Ат - отрицательный контроль по изотипу	1092 ± 41,5	0	н/с	н/с
Пустая α-чFc поверхность	5 ± 0,3	3	н/с	н/с

* Данная колонка показывает среднее значение и стандартное отклонение плотности антитела на поверхности, используемого для связывания пептида ANGPTL8.

Таблица 4
Связывание анти-ANGPTL8 моноклональных антител с пептидом α -ANGPTL3 при 25°C

Захватенное мАп	Уровень захвата мАп (ЕО) *	Связанный 500 нМ пептид α ANGPTL3 (ЕО)	kd (1/с)	t _{1/2} (мин)
H4N15321P	1101 ± 6,1	0	н/с	н/с
H4N15367P2	1116 ± 17,4	0	н/с	н/с
H4N15345P	1096 ± 3,6	0	н/с	н/с
H4N15361P2	1394 ± 12,3	0	н/с	н/с
H4N15347P	1554 ± 54,6	-1	н/с	н/с
H4N15318P	1087 ± 31,5	0	н/с	н/с
H4N15350P2	1298 ± 30,7	0	н/с	н/с
H4N15363P2	1281 ± 13,7	0	н/с	н/с
H4N15346P	1277 ± 26,3	0	н/с	н/с
H4N15334P	1256 ± 5,3	0	н/с	н/с
H4N15335P	1625 ± 31	-1	н/с	н/с
H4N15343P	1129 ± 19,8	0	н/с	н/с
H4N15357P2	1159 ± 13,1	0	н/с	н/с
H4N15353P2	1296 ± 8,5	0	н/с	н/с
H4N15341P	1023 ± 30,1	0	н/с	н/с
H4N15369P2	1196 ± 54,2	0	н/с	н/с
H4N15330P	1168 ± 20,1	-1	н/с	н/с
H4N15362P2	1131 ± 15,5	0	н/с	н/с
H4N15319P	974 ± 3,5	0	н/с	н/с
H4N15316P	1107 ± 24,7	0	н/с	н/с
H4N15323P	1068 ± 16,4	0	н/с	н/с
H4N15354P2	1297 ± 8,5	0	н/с	н/с
H4N15355P2	1323 ± 25,4	0	н/с	н/с
H4N15314P2	1011 ± 3,4	0	н/с	н/с
H4N15331P	1264 ± 16,8	0	н/с	н/с
(α -ANGPTL4 Ат)	1281 ± 50,2	0	н/с	н/с
Ат - отрицательный контроль по изотипу	1092 ± 41,5	0	н/с	н/с
Пустая α -чFc поверхность	5 ± 0,3	0	н/с	н/с

* Данная колонка показывает среднее значение и стандартное отклонение плотности антитела на поверхности, используемого для связывания пептида ANGPTL3.

Таблица 5
Связывание анти-ANGPTL8 моноклональных антител с пептидом α -ANGPTL4 при 25°C

Захваченное мАт	Уровень захвата мАт (ЕО) *	Связанный 500 нМ пептид α ANGPTL4 (ЕО)	Kd (1/с)	t _{1/2} (мин)
H4H15321P	1101 ± 6,1	0	н/с	н/с
H4H15367P2	1116 ± 17,4	0	н/с	н/с
H4H15345P	1096 ± 3,6	0	н/с	н/с
H4H15361P2	1394 ± 12,3	0	н/с	н/с
H4H15347P	1554 ± 54,6	0	н/с	н/с
H4H15318P	1087 ± 31,5	0	н/с	н/с
H4H15350P2	1298 ± 30,7	0	н/с	н/с
H4H15363P2	1281 ± 13,7	0	н/с	н/с
H4H15346P	1277 ± 26,3	0	н/с	н/с
H4H15334P	1256 ± 5,3	1	н/с	н/с
H4H15335P	1625 ± 31	1	н/с	н/с
H4H15343P	1129 ± 19,8	0	н/с	н/с
H4H15357P2	1159 ± 13,1	0	н/с	н/с
H4H15353P2	1296 ± 8,5	0	н/с	н/с
H4H15341P	1023 ± 30,1	0	н/с	н/с
H4H15369P2	1196 ± 54,2	0	н/с	н/с
H4H15330P	1168 ± 20,1	0	н/с	н/с
H4H15362P2	1131 ± 15,5	0	н/с	н/с
H4H15319P	974 ± 3,5	0	н/с	н/с
H4H15316P	1107 ± 24,7	0	н/с	н/с
H4H15323P	1068 ± 16,4	0	н/с	н/с
H4H15354P2	1297 ± 8,5	0	н/с	н/с
H4H15355P2	1323 ± 25,4	0	н/с	н/с
H4H15314P2	1011 ± 3,4	1	н/с	н/с
H4H15331P	1264 ± 16,8	0	н/с	н/с
(α -ANGPTL4 Ат)	1281 ± 50,2	23	1,02E-03	11
Ат - отрицательный контроль по изотипу	1092 ± 41,5	0	н/с	н/с
Пустая α -чFc поверхность	5 ± 0,3	0	н/с	н/с

* Данная колонка показывает среднее значение и стандартное отклонение плотности антитела на поверхности, используемого для связывания пептида ANGPTL4.

Пример 4. Определение кинетических параметров связывания для связывания H4H15341P с полно-размерными белками человеческого и обезьяньего ANGPTL8 методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Равновесную константу диссоциации (K_D) для связывания анти-ANGPTL8 антитела H4H15341P с полноразмерными белками человеческого ANGPTL8 и ANGPTL8 яванского макака определяли методом поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с использованием биосенсорной платформы MASS-1. Для анализа H4H15341P инжестировали над поверхностями сенсоров, на которых были иммобилизованы белки человеческого или обезьяньего ANGPTL8. Все исследования связывания проводили в буфере 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05 об.% сурфактанта Tween-20 (подвижный буфер HBS-ET) при 25°C. Поверхность HSA сенсора дериватизировали за счет связывания через аминокислотные группы поликлонального антитела козы против IgG2a мыши (Southern Biotech, № 1080-01), на котором затем было захвачено примерно 30 ЕО (единиц связывания) человеческого ANGPTL8, экспрессированного с С-концевым маркером Fc IgG2a мыши (α -ANGPTL8-м-Fc; SEQ ID NO: 340) или обезьяньего ANGPTL8, экспрессированного с С-концевым маркером Fc IgG2a мыши (mANGPTL8-м-Fc; SEQ ID NO: 341). Сначала готовили анти-ANGPTL8 мАт в разных концентрациях в подвижном буфере HBS-ET (300 нМ - 1,23 нМ; 3-кратные серийные разведения), а затем инжестировали над поверхностями с иммобили-

зованным ANGPTL8-м-Fc в течение 4 мин при скорости потока 30 мкл/мин, с последующей диссоциацией связанного мАт в подвижном буфере HBS-ET в течение 10 мин.

Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем подгонки сенсограмм связывания в реальном времени к модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса, используя программу для подбора кривых Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации (K_D) и значения полупериода диссоциации ($t^{1/2}$) связывания рассчитывали на основании кинетических констант скоростей следующим образом:

$$K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a} \quad \text{и} \quad t^{1/2} \text{ (мин)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

Кинетические параметры связывания для связывания анти-ANGPTL8 мАт с ч-ANGPTL8-м-Fc и MfANGPTL8-м-Fc при 25°C приведены в табл. 6.

Результаты.

Антитело H4H15341 связывало белки как человеческого, так и обезьяньего ANGPTL8, иммобилизованные на поверхности сенсора, и во время регистрируемой фазы диссоциации поддающаяся измерению диссоциация отсутствовала. Для оценки аффинности связывания константу скорости диссоциации, k_d , фиксировали на верхнем пределе детекции в условиях эксперимента, 1,0E-05 1/с. Значения равновесной константы диссоциации (K_D) связывания H4H15341P с ч-ANGPTL8-м-Fc и MfANGPTL8-м-Fc, по оценкам, составляли 117 и 86 пМ или менее соответственно.

Таблица 6

Кинетические параметры связывания для связывания H4H15341P с ч-ANGPTL8-м-Fc и MfANGPTL8-м-Fc при 25°C

Поверхность захвата	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t^{1/2}$ (мин)
чANGPTL8-мFc	8,50E+04	1,00E-05*	≤1,17E-10	≥1155
MfANGPTL8-мFc	1,16E+05	1,00E-05*	≤8,60E-11	≥1155

* Никакой диссоциации анти-ANGPTL8 мАт не наблюдали в условиях эксперимента; таким образом, значение k_d было фиксировано на верхнем пределе детекции 1,00E-05 с⁻¹.

Пример 5. Определение специфичности связывания в отношении человеческого и обезьяньего ANGPTL8 методом интерферометрии биослоя (ИБС).

Связывание анти-ANGPTL8 антител с белками человеческого и обезьяньего ANGPTL8 изучали с использованием метода интерферометрии биослоя с биосенсорной платформой Octet HTX (ForteBio, A Division of Pall Life Sciences). Все эксперименты проводили при 25°C в буфере 10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,05 об.% сурфактанта Tween-20 и 1 мг/мл БСА в реакционном многолуночном планшете с перемешиванием при 1000 об/мин. Примерно 1,6 нмоль человеческого ANGPTL8, полученного с С-концевым маркером Fc IgG2a мыши (ч-ANGPTL8-м-Fc; SEQ ID NO: 340) или ANGPTL8 яванского макака, полученного с С-концевым маркером Fc IgG2a мыши (MfANGPTL8-м-Fc; SEQ ID NO: 341), иммобилизовали на биосенсорах Octet с анти-м-Fc (АМС), погружая сенсоры в лунки, содержащие 10 мкг/мл каждого белка, на 4 мин. В тех же условиях отрицательный контроль в виде белка с таким же маркером мFc (ч-LDLR-м-Fc) также связывали с АМС сенсором. Затем все четыре сенсора, три связанные с белками и один пустой, погружали в лунки, содержащие 100 нМ разных анти-ANGPTL8 моноклональных антител или контроля по изотипу, на 4 мин. Сигналы связывания, наблюдаемые после 4-минутного этапа связывания, приведены в табл. 7.

Результаты.

Из 25 анти-ANGPTL8 мАт, протестированных в данном исследовании, 24 антитела демонстрировали сигналы связывания, превышающие максимальные сигналы связывания на сенсорах с посторонним контролем (0,03 нмоль; это значение использовали для расчета сигналов связывания, кратно превышающих фон). Из 24 антител, связывающих человеческий ANGPTL8, 20 были положительны в отношении связывания белка обезьяньего ANGPTL8. 4 антитела, которые не связывали белок обезьяньего ANGPTL8, также демонстрировали низкий сигнал при связывании белка человеческого ANGPTL8, с величинами, в 1-2 превышающими фоновый сигнал связывания. Из 24 антител, связывающих белок человеческого ANGPTL8, 4 антитела (H4H15362P2, H4H15321P, H4H15330P, H4H15367P2) демонстрировали сигналы связывания в 10 раз выше фона. Другая группа из 12 антител демонстрировала сигналы связывания в 5-10 раз выше фона. Остальные антитела связывали белок человеческого ANGPTL8 с сигналами связывания в 1-5 раз выше уровня фона.

Таблица 7

Специфичность связывания 100 нМ анти-ANGPTL8 моноклональных антител с человеческим и обезьяньим ANGPTL8-м-Fc, иммобилизованными на биосенсорах Octet

Обозначение мАт	Ответ связывания мАт (нмоль)			
	Поверхность с иммобилизованным чANGPTL8-мFc	Поверхность с иммобилизованным мfANGPTL8-мFc	Поверхность с иммобилизованным посторонним контролем (чLDLR-мFc)	Пустой АМС сенсор
H4N15362P2	0,39	0,36	0,03	0,01
H4N15321P	0,36	0,51	0,01	0,00
H4N15330P	0,34	0,39	0,02	0,01
H4N15367P2	0,32	0,33	0,01	0,00
H4N15363P2	0,25	0,26	0,01	0,02
H4N15347P	0,25	0,29	0,01	0,03
H4N15345P	0,25	0,31	0,00	0,01
H4N15319P	0,22	0,26	-0,01	0,00
H4N15361P2	0,20	0,21	0,01	0,02
H4N15318P	0,19	0,20	0,01	0,01
H4N15323P	0,18	0,15	0,00	0,00
H4N15350P2	0,17	0,20	0,00	-0,01
H4N15343P	0,17	0,20	-0,01	0,01
H4N15331P	0,16	0,21	0,01	0,01
H4N15355P2	0,15	0,13	0,02	0,03
H4N15353P2	0,15	0,11	0,02	0,02
H4N15369P2	0,14	0,17	0,00	0,01
H4N15357P2	0,13	0,08	0,01	0,02
H4N15341P	0,12	0,10	0,02	0,03
H4N15346P	0,07	0,01	0,00	-0,01
H4N15335P	0,06	0,04	0,01	0,01
H4N15354P2	0,05	0,03	0,01	0,02
H4N15334P	0,05	0,01	0,00	0,03
H4N15314P2	0,04	0,01	0,01	0,00
H4N15316P	0,03	0,02	0,02	0,02
Ат - отрицательный контроль по изотипу	0,01	0,00	0,01	0,01

Пример 6. In vivo эффект анти-ч-ANGPTL8 IgG4 антител на уровни циркулирующих триглицеридов у мышей, гуманизированных по ANGPTL8.

Эффект анти-ч-ANGPTL8 антител на сывороточные уровни триглицеридов (ТГ) определяли у мышей, гуманизированных по ANGPTL8. У мышей предварительно собирали кровь за 7 дней до эксперимента и разделяли их на группы, по 5 мышей каждая, для каждого тестируемого антитела. Антитела вводили в дозе 10 мг/кг (анти-ч-ANGPTL8 и совпадающий по изотипу (ч-IgG4) контроль с посторонней специфичностью) подкожной инъекцией в день 0 исследования. У мышей (не голодающих) собирали кровь в последующие дни после инъекций антител, и уровни ТГ определяли в сыворотке при помощи биохимического анализатора сыворотки ADVIA® 1800 (Siemens). Средние значения рассчитывали для каждой временной точки для всех тестируемых антител. Результаты, выраженные в виде (среднего значения \pm SEM) сывороточной концентрации ТГ, приведены в табл. 8-13.

Также определяли уровни циркулирующего анти-ч-ANGPTL8 (сывороточные Ат) стандартным методом ELISA. Вкратце, планшеты покрывали антителом козы против Fc человеческого иммуноглобулина (Sigma-Aldrich) для захвата сывороточных Ат. Затем в планшеты добавляли сыворотку, и захваченные антитела обнаруживали по хемоллюминесценции с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела козы против IgG человека (Sigma-Aldrich). Результаты, выраженные в виде среднего значения \pm SEM, приведены в табл. 14-19. Контроль: мыши, получавшие совпадающее по изотипу контрольное Ат.

Результаты.

Был протестирован эффект 25 мАт к ч-ANGPTL8 на уровни циркулирующих ТГ у мышей, гумани-

зированных по ANGPTL8. Антитело H4N15341P вызывало значительное снижение уровней циркулирующих ТГ (в среднем до 68%) после введения (в сравнении с контрольным мАт).

Таблица 8

Исследование 1, сывороточные триглицериды (мг/дл)

Дни	Антитело									
	Контроль		H4N15321P		H4N15331P		H4N15343P		H4N15367P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	205,4	14,20	203,8	19,68	206,6	16,20	205,2	12,13	203,6	14,21
1	233,6	16,93	239,4	28,61	259,8	35,52	196,8	16,05	222,0	27,41
4	210,4	12,79	233,2	26,19	244,4	33,83	175,2	10,32	234,8	27,28
7	261,0	19,66	235,6	33,82	241,8	55,74	201,8	23,50	203,2	27,79

Таблица 9

Исследование 2, сывороточные триглицериды (мг/дл)

Дни	Антитело							
	Контроль		H4N15341P		H4N15319P		H4N15318P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	214,8	20,08	211,4	21,67	213,6	20,50	212,8	20,00
1	255,4	25,18	82,0	3,35	217,4	26,92	235,2	24,62
4	228,6	33,43	93,6	7,69	195,0	29,93	270,6	34,28
7	197,0	21,22	90,8	7,68	235,4	35,70	209,6	31,88
14	223,0	14,98	126,4	21,75	185,2	29,94	166,0	24,58

Дни после инъекции	Антитело			
	H4N15355P2		H4N15345P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	214,4	19,18	213,0	20,34
1	248,2	45,93	228,8	37,97
4	221,2	30,30	195,80	23,87
7	254,2	37,93	252,60	25,24
14	219,4	36,69	190,60	13,13

Таблица 10

Исследование 3, сывороточные триглицериды (мг/дл)

Дни	Антитело									
	Контроль		H4N15350P2		H4N15314P2		H4N15330P		H4N15361P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	247,8	23,88	242,8	21,60	244,0	26,34	243,2	22,29	242,4	25,29
1	214,6	20,37	206,6	21,60	228,2	35,33	206,6	25,44	215,4	20,20
4	222,4	13,78	198,2	22,61	192,4	17,25	216,6	15,84	200,0	15,89
7	288,8	35,41	274,6	45,48	238,6	21,21	244,4	14,61	247,4	37,93

Таблица 11

Исследование 4, сывороточные триглицериды (мг/дл)

Дни после инъекции	Антитело									
	Контроль		H4N15357P		H4N15363P2		H4N15347P		H4N15369P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	197,0	18,29	201,6	25,18	201,6	26,15	200,4	24,11	198,8	22,43
1	227,6	46,41	221,6	37,55	189,4	5,63	194,6	28,33	217,0	39,88
6	194,0	18,06	211,2	35,96	190,6	20,21	248,2	16,12	223,0	25,11

Таблица 12

Исследование 5, сывороточные триглицериды (мг/дл)

Дни после инъекции	Антитело							
	Контроль		H4N15353P2		H4N15323P		H4N15362P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	199,2	26,68	197,4	27,02	199,8	30,33	200,8	27,55
2	217,2	16,09	184,4	28,67	179,8	35,99	166,6	26,76
8	161,8	18,58	185,4	24,78	187,0	38,76	180,2	18,22
14	227,2	33,70	216,4	11,74	212,4	31,29	173,2	17,75

Дни после инъекции	Антитело			
	H4N15334P		H4N15354P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	199,8	26,25	200,0	26,33
2	183,0	16,93	169,8	23,14
8	160,0	16,56	162,6	20,50
14	167,6	18,73	197,4	34,20

Таблица 13

Исследование 6, сывороточные триглицериды (мг/дл)

Дни после инъекции	Антитело							
	Контроль		H4N15316P		H4N15335P		H4N15346P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
-7	232,0	24,94	232,0	28,26	232,4	23,88	232,8	30,30
2	211,0	23,19	248,2	35,35	203,2	6,785	197,2	20,42
7	256,8	32,02	249,6	35,72	248,0	17,28	234,8	66,74

Таблица 14

Исследование 1, сывороточные Ат (мкг/мл)

Дни после инъекции	Антитело									
	Контроль		H4N15321P		H4N15331P		H4N15343P		H4N15367P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
1	64,1	9,0	76,4	8,6	9,8	2,0	74,4	8,5	113,0	9,6
4	55,8	6,3	66,5	4,6	3,3	0,7	68,3	4,4	101,4	11,3

Таблица 15

Исследование 2, сывороточные Ат (мкг/мл)

Дни после инъекции	Антитело							
	Контроль		H4N15341P		H4N15319P		H4N15318P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
1	50,8	3,9	104,0	18,7	81,8	8,2	74,4	8,5
4	51,2	9,5	70,6	23,6	59,1	9,6	68,3	4,4
7	40,9	5,4	50,7	13,3	46,8	8,9	68,3	4,4
14	32,2	3,1	8,2	4,6	24,1	8,7	68,3	4,4
Дни после инъекции	Антитело							
	H4N15355P2				H4N15345P			
	Среднее		SEM		Среднее		SEM	
1	68,4		3,8		59,3		3,6	
4	58,4		3,0		46,3		16,2	
7	35,7		6,6		50,1		3,9	
14	3,1		0,8		35,9		4,6	

Таблица 16

Исследование 3, сывороточные Ат (мкг/мл)

Дни после инъекции	Антитело									
	Контроль		H4N15350P2		H4N15314P2		H4N15330P		H4N15361P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
1	47,3	7,0	57,2	23,4	89,9	13,0	38,3	14,7	50,0	13,6
4	50,6	13,4	66,1	22,6	69,9	12,9	35,4	0,9	57,4	10,1
7	38,8	9,2	39,9	14,7	48,6	17,3	30,0	5,1	38,7	11,1

Таблица 17

Исследование 4, сывороточные Ат (мкг/мл)

Дни после инъекции	Антитело									
	Контроль		H4N15357P2		H4N15363P2		H4N15347P		H4N15369P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
1	100,9	100,9	78,4	26,7	93,2	10,1	53,6	7,5	99,7	15,6
6	84,0	84,0	56,9	14,8	62,0	7,6	9,5	2,9	68,0	12,0

Таблица 18

Исследование 5, сывороточные Ат (мкг/мл)

Дни после инъекции	Антитело							
	Контроль		H4N15353P2		H4N15323P		H4N15362P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
2	93,7	14,4	63,5	17,6	99,9	34,5	91,0	24,6
8	79,8	8,7	42,8	11,1	50,3	9,7	50,8	10,3
14	55,1	11,4	18,2	14,0	32,3	10,0	29,5	20,9

Дни после инъекции	Антитело			
	H4H15334P		H4H15354P2	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
2	64,4	15,0	71,3	7,2
8	38,7	7,1	46,0	15,4
14	8,6	4,6	30,1	26,6

Таблица 19

Исследование 6, сывороточные Ат (мкг/мл)

Дни после инъекции	Антитело							
	Контроль		H4H15316P		H4H15335P		H4H15346P	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM	Среднее	SEM
2	87,4	9,2	79,3	18,5	66,9	17,5	61,1	22,8
7	97,4	23,0	77,9	12,8	78,6	16,2	56,7	23,7

Пример 7. Зависимый от дозы ответ на анти-ч-ANGPTL8 антитело H4H15341P у гуманизированных по ANGPTL8 мышей.

Эффекты разных доз анти-ч-ANGPTL8 мАт, H4H15341P, на сывороточный уровень триглицеридов (ТГ) оценивали у гуманизированных по ANGPTL8 мышей. У мышей предварительно собирали кровь за 7 дней до эксперимента и разделяли их на группы, по пять мышей каждая, для каждой тестируемой дозы. Вводили H4H15341P в дозах 1, 5, 10 и 25 мг/кг и совпадающий по изотипу контроль (ч-IgG4) с посторонней специфичностью в дозе 10 мг/кг однократной подкожной инъекцией в день 0 исследования. У мышей (не голодающих) собирали кровь в дни 2, 7, 14 и 21 после инъекции антител и определяли уровни ТГ в сыворотке при помощи биохимического анализатора сыворотки ADVIA® 1800 (Siemens). Рассчитывали средние значения для каждой временной точки. Результаты, выраженные в виде (среднего значения \pm SEM) сывороточных концентраций ТГ, приведены на фиг. 1.

Уровни циркулирующих человеческих антител (сывороточные Ат) определяли стандартным методом ELISA. Вкратце, планшеты покрывали антителом козы против Fc человеческих иммуноглобулинов (Sigma-Aldrich) для захвата сывороточных Ат. Затем в планшеты добавляли сыворотку и захваченные антитела обнаруживали по хемоллюминесценции с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) антитела козы против IgG человека (Sigma-Aldrich). Результаты, выраженные в виде среднего значения \pm SEM, приведены на фиг. 2. Контроль по Ат: мыши, получавшие совпадающее по изотипу контрольное Ат.

Результаты.

Был протестирован эффект 4 разных доз H4H15341P (анти-ч-ANGPTL8) на уровни циркулирующих ТГ и холестерина у гуманизированных по ANGPTL8 мышей. H4H15341P вызывало зависимое от дозы устойчивое значительное снижение сывороточных уровней ТГ (в среднем до 66%, в сравнении с контрольным Ат), при этом доза 5 мг/кг была наименьшей эффективной дозой. Эффект на уровни общего холестерина отсутствовал.

Пример 8. Оценка активности липопротеинлипазы (ЛПЛ) после введения анти-ч-ANGPTL8 мАт гуманизированным по ANGPTL8 мышам.

Эффект введения анти-ч-ANGPTL8 мАт (H4H15341P) на активность ЛПЛ оценивали у гуманизированных по ANGPTL8 мышей. У мышей предварительно собирали кровь за 7 дней до эксперимента и разделяли их на группы, по пять мышей каждая, для каждого тестируемого мАт. H4H15341P и контрольное Ат вводили в дозе 10 мг/кг однократной подкожной инъекцией в день 0 исследования. В день 4 исследования мышам вводили внутривенной инъекцией через хвостовую вену гепарин в дозе 250 Ед/кг, который вызывает высвобождение ЛПЛ из эндотелиальных поверхностей сосудов. Через 5 мин у мышей собирали кровь из ретроорбитального синуса, и обработанную гепарином плазму собирали и фракционировали для отделения ЛПЛ от печеночной липазы методом хроматографии на гепарин-сефарозе. Обработанную гепарином плазму наносили на 1,0-мл колонки HiTrap с гепарин-сефарозой (GE Healthcare) под контролем системы GE Akta Prime, уравновешенные буфером, содержащим 0,25 М NaCl, 20% глицерина, 1% БСА, 10 мМ фосфата натрия, pH 6,5. Колонку промывали 10 мл уравновешивающего буфера и элюировали 30 мл градиента NaCl (0,25-1,5 М в буфере, содержащем 20% глицерина, 1% БСА, 10 мМ фосфата натрия, pH 6,5). Объединяли полученные фракции, соответствующие пикам печеночной липазы и ЛПЛ, и активность липазы анализировали с использованием субстрата липазы Enzchek от компании Invitrogen (каталожный № E33955). Данные по кинетике реакции получали на планшетном ридере Molecular Devices SpectraMax i3 при длине волны возбуждения 482 нм и длине волны эмиссии 518 нм. Результаты, выраженные в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) (среднее значение \pm SEM), приведены

на фиг. 3. Контроль по Ат: мыши, получавшие совпадающее по изотипу контрольное Ат.

Результаты.

Полученные результаты показали, что введение Н4Н15341Р (анти-ч-ANGPTL8) гуманизированным по ANGPTL8 мышам приводит к значительному возрастанию активности ЛПЛ и не оказывает влияние на активность печеночной липазы.

Пример 9. Тест на толерантность к липидам у гуманизированных по ANGPTL8 мышей, получавших анти-ч-ANGPTL8 мАт Н4Н15341Р.

Эффект ингибирования ANGPTL8 за счет мАт Н4Н15341Р на клиренс триглицеридов оценивали при острой жировой нагрузке. У гуманизированных по ANGPTL8 мышей собирали кровь за 8 дней до эксперимента и разделяли их на группы, по 6 мышей в каждой, для каждого тестируемого мАт. Н4Н15341Р и совпадающее по изотипу контрольное Ат вводили в дозе 10 мг/кг однократной подкожной инъекцией в день 0 исследования. В день 4 исследования мышей лишали корма на 4 ч, с последующим внутривенным введением 20% интралипида (Baxter Healthcare, IL) в дозе 2,5 мкл/г массы тела. Уровень ТГ оценивали в крови, собранной из хвостовой вены, в соответствующие временные точки. Результаты, выраженные в виде (среднего значения \pm SEM) концентраций ТГ, приведены на фиг. 4. Контроль по Ат: мыши, получавшие совпадающее по изотипу контрольное Ат.

Результаты.

Введение Н4Н15341Р (анти-ч-ANGPTL8) гуманизированным по ANGPTL8 мышам приводит к значительному снижению уровней ТГ после острой жировой нагрузки, в сравнении с контрольным антителом. Эти данные свидетельствуют о том, что Н4Н15341Р за счет блокирования ANGPTL8 стимулирует ускорение клиренса ТГ из системы циркуляции.

Пример 10. Картирование линейных эпитопов ангиопоэтин-подобного белка 8 с помощью сверхчувствительной платформы HiSense.

Pepscan анализ с использованием линейных пептидов HiSense проводили для установления линейных эпитопов для антител Н4Н15341Р и Н4Н15367Р2. Исследование проводили на Pepscan Presto BV, (Zuidersluisweg 2, 8243RC Lelystad, The Netherlands). Все Pepscan данные хранятся в пакете программ Replab™, патентованном приложении для баз данных, разработанном в собственной организации и созданном на основе компилятора окончательной обработки для хранения баз данных PostgreSQL.

Синтез пептидов.

Для реконструкции эпитопов на целевой молекуле синтезировали библиотеку пептидов. Подложку из функционализированного полипропилена с аминогруппами получали путем прививания с использованием патентованного гидрофильного полимерного состава, последующей реакции с т-бутилоксикарбонил-гексаметилендиамином (WocHMDA) с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC) с N-гидроксibenзотриазолом (HOBt) и последующего отщепления Woc-групп с помощью трифторуксусной кислоты (TFA). Выполняли стандартный пептидный синтез с Fmoc для синтеза пептидов на функционализированной твердой подложке с аминогруппами с использованием адаптированной рабочей станции для жидкостей JANUS (Perkin Elmer).

Связывание ангиопоэтин-подобного белка 8 с матрицей.

Целевой белок связывали с миникартой в качестве положительного контроля. Для связывания ангиопоэтин-подобного белка 8 (ч-ANGPTL8-м-Fc) с матрицами использовали два сшивающих агента - м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS) и глутаральдегид (GDA). В случае MBS 40 мкл ч-ANGPTL8-м-Fc смешивали с 1 мкл MBS (2 мг/мл), инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре, а затем связывали с матрицей в положениях, содержащих мотив линкера CGGCGG (SEQ ID NO: 346). В случае связывания при помощи GDA 0,05% GDA в фосфатном буфере (pH 5,0) наносили на матрицу, инкубировали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем ч-ANGPTL8-м-Fc в концентрации 5 или 20 мкг/мл в фосфатном буфере с pH 8,0 связывали с матрицей только в положениях, содержащих Gly, для обеспечения связывания со свободным N-концом.

Скрининг методом ELISA.

Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов тестировали методом ELISA на базе PEPCAN. Пептидные матрицы инкубировали с раствором первичного антитела (в течение ночи при 4°C). После промывания пептидные матрицы инкубировали с разведенным 1/1000 соответствующим конъюгатом антитела с пероксидазой (конъюгат антитела козы против человеческих иммуноглобулинов с HRP, Southern Biotech, каталожный № 2010-05) в течение 1 ч при 25°C. После промывания добавляли субстрат пероксидазы 2,2'-азиноди-3-этилбензтиазолин сульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3% H₂O₂. Через 1 ч измеряли степень развития окраски. Развитие окраски количественно определяли при помощи устройства с зарядовой связью (CCD) - камеры и системы обработки изображений.

Подробности скрининга.

Связывание антитела зависит от сочетания факторов, включая концентрацию антитела, а также количества и природу конкурирующих белков в буфере для ELISA. Кроме того, на связывание влияют условия предварительного покрытия (специфической обработки пептидных матриц перед инкубацией с экспериментальным образцом). Эти данные представлены следующим образом.

<u>Название</u>	<u>Разведение</u>	<u>Буфер для образцов</u>	<u>Предварительная обработка</u>
H4N15341P	1 мкг/мл	100% SQ	100% SQ
H4N15367P2	1 мкг/мл	100% SQ	100% SQ
Отрицательный контроль по изотипу	1 мкг/мл	100% SQ	100% SQ

В случае буфера Pepscan и предварительной обработки (SQ) числа указывают относительные количества конкурирующего белка (сочетание лошадиной сыворотки и овальбумина).

Обработка данных.

Значения, полученные с помощью CCD-камеры, находились в диапазоне 0-3000 мЕОП, как в случае стандартного ELISA-ридера для 96-луночных планшетов. Результаты количественно обрабатывали и хранили в базе данных Perlab. Иногда в лунке находился воздушный пузырь, приводящий к получению ложноположительных результатов, карты инспектировали вручную и любые значения, вызванные присутствием воздушного пузыря, считали за 0.

Контроль качества синтеза.

Для подтверждения качества синтезированных пептидов параллельно синтезировали отдельный набор пептидов положительного и отрицательного контроля. Их скрининг проводили с использованием антитела 57.9 (Posthumus, et al. 1990 J Virol 64:3304-3309).

Результаты.

Дизайн пептиды.

Синтезировали следующие наборы пептидов на целевой последовательности.

Человеческий ANGPTL8, зрелая последовательность, аминокислоты 22-198 из NP_061157.3

1 APMGGPELAQ HEELTLFNG TLQLGQALNG VYRTTEGRLT KARNSLGLYG 50

51 RTIELLGQEV SRGRDAAQEL RASLLETQME EDILQLQAEA TAEVLGQVAQ

100

101 AQKVLKRSVQ RLEVQLRSVA LGPAYREFEV LKANADKQSH ILWALTGHVQ

150

151 RQRREMVAQQ HRLRQIQERL HTAALPA 177 (SEQ ID NO: 347)

Антитела тестировали на связывание серии 15-мерных пептидов, покрывающих полную последовательность ANGPTL8, каждый пептид со смещением на одну аминокислоту от соседнего. В серию тестируемых пептидов также были включены пептиды с заменами двойными остатками аланина ("AA") для более тонкого анализа эпитопа.

Набор 1. Миметик: линейный. Тип: LIN.

Описание. Пептиды длиной 15 аминокислот из целевой последовательности ангиопоэтин-подобного белка 8 со смещением на один остаток.

Последовательности (первые 10)

APMGGPELAQHEELT (SEQ ID NO: 348)

PMGGPELAQHEELTL (SEQ ID NO: 349)

MGGPELAQHEELTLL (SEQ ID NO: 350)

GGPELAQHEELTLF (SEQ ID NO: 351)

GPELAQHEELTLFNG (SEQ ID NO: 352)

PELAQHEELTLFNG (SEQ ID NO: 353)

ELAQHEELTLFNGT (SEQ ID NO: 354)

LAQHEELTLFNGTL (SEQ ID NO: 355)

AQHEELTLFNGTLQ (SEQ ID NO: 356)

QHEELTLFNGTLQL (SEQ ID NO: 357)

НАБОР 2. Миметик: линейный. Тип: LIN.AA.

Описание. Пептиды набора 1, но с остатками в положениях 10 и 11, замененными на Ala. В случае присутствия естественного остатка Ala в каком-либо из этих положений, его заменяют Gly. Порядок пептидов в этом наборе рандомизирован. Показан фактический порядок на матрице.

Последовательности (первые 10)

TAEVLGEVAAGQKVL (SEQ ID NO: 358)
 VYRTTEGRLAAARNS (SEQ ID NO: 359)
 GVYRTTEGRAAKARN (SEQ ID NO: 360)
 VQRLEVQLRAGWLGP (SEQ ID NO: 361)
 LTGHVQRQRAAMVAQ (SEQ ID NO: 362)
 VLKAHADKQAAILWA (SEQ ID NO: 363)
 LRDSVQRLEAALRSA (SEQ ID NO: 364)
 RREMVAQQHAARQIQ (SEQ ID NO: 365)
 VSRGRDAAQARASL (SEQ ID NO: 366)
 AYREFEVLKGAADKQ (SEQ ID NO: 367)

Необработанные результаты скрининга методом ELISA были получены и использованы для построения графика (коробчатая диаграмма, данные не представлены) для отображения каждого набора данных и указания среднего сигнала ELISA, распределения и выбросов в каждом наборе данных. В зависимости от условий эксперимента (количества антитела, силы блокирования и так далее) были получены разные распределения данных анализа ELISA.

Антитело H4H15367P2.

При тестировании в условиях высокой строгости антитело H4H15367P2 сильно связывало только один линейный пептид, состоящий из последовательности 1APMGGPELAQHEELT15 (SEQ ID NO: 348). Этот образец тестировали дважды в одних и тех же условиях и повторно получали тот же самый результат. Антитело H4H15367P2 также сильно связывало ангиопоэтин-подобный белок 8, который был связан с матрицей в качестве положительного контроля. Интересно, что несколько более слабое связывание было получено с целевым белком, связанным при помощи MBS, чем с белком, связанным при помощи GDA.

Антитело H4H15341P.

При тестировании в условиях высокой строгости антитело H4H15341P сильно связывало серию линейных пептидов, содержащих общую последовательность ¹⁵⁰QRQRREMQ₁₅₉ (SEQ ID NO: 368). Сравнение профилей интенсивности, полученных для набора 1, (миметики природных линейных эпитопов) и набора 2 (мутанты с двойным Ala), указывает на то, что остатки R154, E155 и Q159 необходимы для связывания антитела. Антитело H4H15341P также сильно связывало ангиопоэтин-подобный белок 8, который был связан с матрицей в качестве положительного контроля, независимо от метода иммобилизации.

Отрицательный контроль по изотипу.

Антитело - отрицательный контроль по изотипу не связывало ни один из пептидов, находящихся на матрице. Более того, не было обнаружено никакого заметного связывания с ангиопоэтин-подобным белком 8, который был связан с матрицей в качестве положительного контроля. Кроме того, антитело - отрицательный контроль по изотипу тестировали с конъюгатом вторичного антитела козы против человеческих иммуноглобулинов, используемым в Pepscan ELISA. Антитело могло быть узнано этим вторичным антителом.

Вывод.

В данном исследовании были протестированы три антитела на пептидных матрицах HiSense. Удалось установить предположительные линейные эпитопы для двух антител. Несмотря на неоднократную инкубацию, антитело - отрицательный контроль по изотипу не связывалось с матрицей. Предположительные коровьи эпитопы, идентифицированные в данном исследовании, были следующими.

<u>Антитело</u>	<u>Коровий эпитоп</u>
H4H15341P	¹⁵⁰ QRQRREMQ ₁₅₉ (SEQ ID NO: 368)
H4H15367P2	¹ APMGGPELAQHEELT ₁₅ (SEQ ID NO: 348)
Отрицательный контроль по изотипу	-

Таким образом, антитела H4H15341P и H4H15367P2 узнают отличающиеся линейные последовательности на С- и N-концах соответственно. Тот факт, что сигнал, полученный для антитела H4H15367P2, при связывании с помощью MBS был слабее, чем при связывании с помощью GDA, наряду с его локализацией на крайней области N-конца, указывает на то, что N-концевой амин сам по себе может быть частью эпитопа. Кроме того, в случае антитела H4H15341P мутанты с двойными остатками аланина позволили точно установить остатки, являющиеся критическими для связывания (остатки, затененные светло-серым цветом, выше).

Антитело H4H15341P направлено на С-концевую область ангиопоэтин-подобного белка 8, в то время как H4H15367P2 направлено на крайний N-конец. Антитело - отрицательный контроль по изотипу не связывалось с матрицей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ангиопоэтин-подобным белком (ANGPTL) 8, содержащее определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) из пары переменная область тяжелой цепи (HCVR)/переменная область легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 162/170.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее домены HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 164/166/168/172/174/176.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, которое связывается с эпитопом с SEQ ID NO: 368.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, содержащее пару HCVR/LCVR с SEQ ID NO: 162/170.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которое связывается с ANGPTL8 человека при 25°C с величиной K_D менее примерно 150 пМ и связывается с ANGPTL8 обезьяны при 25°C с величиной K_D менее примерно 90 пМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вышеуказанных пунктов, которое снижает уровни триглицеридов у млекопитающего в период времени примерно от 7 до 21 дня при подкожном введении в диапазоне доз от примерно 5 до примерно 25 мг/кг.

7. Антитело по любому из вышеуказанных пунктов, которое представляет собой IgG1 или IgG4.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6.

9. Рекombинантный вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.

10. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.9.

11. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-6, включающий культивирование клетки-хозяина по п.10 в условиях, обеспечивающих продукцию антитела или его фрагмента, и восстановление полученного антитела или его фрагмента.

12. Фармацевтическая композиция для нейтрализации, ингибирования, блокирования, прекращения, снижения или отрицательного воздействия на активность ANGPTL8, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Способ ингибирования активности ANGPTL8 у пациента, включающий введение пациенту одного или нескольких антител или антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп.1-6, или фармацевтической композиции по п.12.

14. Способ лечения заболевания или состояния, частично связанного с повышенными уровнями активности ANGPTL8, включающий введение одного или более антител или антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп.1-6, или фармацевтической композиции по п.12 пациенту.

15. Способ лечения состояния или заболевания, частично связанного с высокими уровнями триглицеридов в крови или отличающегося высокими уровнями триглицеридов, или уменьшения тяжести или снижения частоты по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с указанным состоянием или заболеванием, включающий введение пациенту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4, или фармацевтической композиции по п.12.

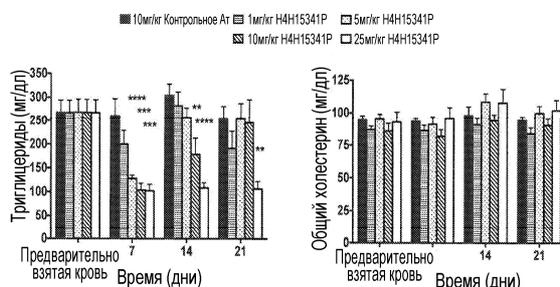
16. Способ по п.15, причем состояние или заболевание выбрано из группы, состоящей из гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии, дислипидемии (атерогенной дислипидемии, диабетической дислипидемии, смешанной дислипидемии), гипертриглицеридемии, тяжелой гипертриглицеридемии с уровнем ТГ >1000 мг/дл и сопутствующим острым панкреатитом, гиперхолестеринемии, хиломикронемии, ожирения, метаболического синдрома, диабета, липодистрофии, липоатрофии, которые являются следствием или вызваны изменением ApoC2, дефицитом ApoE, повышением уровней ApoB, увеличением продукции и/или уменьшением элиминации липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), лечением некоторыми лекарственными средствами (например, вызываемая лечением глюкокортикоидами дислипидемия), а также любой генетической предрасположенностью, диетой или образом жизни, приводящими к повышению уровней триглицеридов или липидов.

17. Способ по п.15, причем состояние или заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из атеросклероза, аневризмы, гипертензии, стенокардии, инсульта, цереброваскулярных заболеваний, застойной сердечной недостаточности, болезней коронарных артерий, инфаркта миокарда и болезней периферических сосудов.

18. Способ по п.15, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят пациенту в сочетании с вторым терапевтическим средством, выбранным из группы, состоящей из ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А (HMG-CoA) редуктазы; ингибиторов аполипопротеина С-III; ингибиторов обратного захвата холестерина и/или повторного захвата желчных кислот; ниацина; фибратов или амфипатических карбоновых кислот; активаторов фактора транс-

крипции LXR (например, 22-гидроксихолестерина) или фиксированных комбинаций (например, эзетимб плюс симвастатин); статина с секвестрантом желчных кислот (например, холестирамин, колестипол, колесевилам); фиксированной комбинации ниацин плюс статин (например, ниацин с ловастатином); других снижающих уровень липидов средств (например, этиловых эфиров омега-3-жирных кислот); выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается ангиопоэтин-подобным белком 3 (ANGPTL3), ангиопоэтин-подобным белком 4 (ANGPTL4), ангиопоэтин-подобным белком 5 (ANGPTL5), ангиопоэтин-подобным белком 6 (ANGPTL6) и пробелком конвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9) человека; инсулина, аналога инсулина, бигуанида (метформин), сульфонилмочевины (например, глибурид, глипизид), агониста рецепторов PPAR-гамма (например, пиоглитазон, розиглитазон), ингибитора альфа-глюкозидазы (например, акарбоза, воглибоз), агониста рецепторов глюкагонподобного пептида 1 (GLP-1) (например, баета® (эксенатид), трулисити™ (дулаглутид), виктоза® (лираглутид), ликсумия® (ликсисенатид), танзеум™ (албиглутид), либо аналога любого из вышеперечисленных, ингибитора дипептидилпептидазы IV (DPP-4) (например, саксаглиптин (онглиза®), ситалиптин (янувия®) и вилдаглиптин (галвус®)), ингибитора натрий-глюкозного котранспортера 2 (SGLT2) (например, инвокана™ (канаглифлозин), форксига® (дапаглифлозин), эмпаглифлозин, ипраглифлозин, тофоглифлозин, симлина® (прамлинтид)), антагониста рецепторов глюкагона, несульфонилмочевинный релизинг фактора гормона роста, аналога инсулина (например, препараты быстрого действия лиспро, аспарт, глулизин и препараты длительного действия инсулин детемир, инсулин деглудек или инсулин гларгин), полипептидов эксендина-4, агонистов бета-3 адренорецепторов, ингибиторов обратного захвата холестерина и/или повторного захвата желчных кислот, антагонистов ЛНП-холестерина, антагонистов белка-переносчика холестеринных эфиров (например, торцетрапиб, анацетрапиб, далцетрапиб или эвацетрапиб), антагонистов рецепторов эндотелина, антагонистов гормона роста, сенсibilизаторов инсулина, миметиков или агонистов амилина, антагонистов каннабиноидных рецепторов, меланокортинов, агонистов рецепторов меланинконцентрирующего гормона, СИОЗСН, миметика фактора роста фибробластов 21 (FGF21), агониста рецепторов 1с фактора роста фибробластов (FGFR1с), ингибитора образования конечного продукта усиленного гликозилирования (например, аминогуанидин) и ингибиторов протеин-тирозин фосфатазы, анальгетика и противовоспалительного средства.

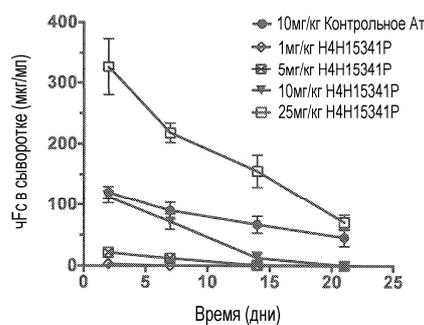
19. Способ по п.18, причем ингибитор HMG-CoA редуктазы выбран из группы, состоящей из церивастатина, аторвастатина, симвастатина, питавастатина, розувастатина, флувастатина, ловастатина и правастатина.



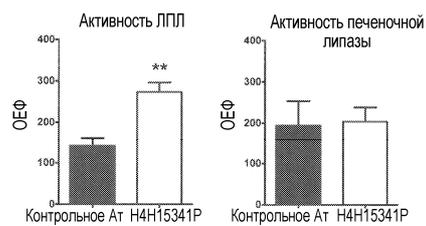
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Фиг. 1

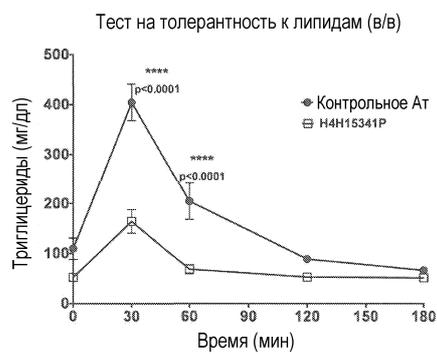
Сывороточные Ат



Фиг. 2

** $p < 0.01$

Фиг. 3



Фиг. 4

