

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040479**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.08(21) Номер заявки
201892272(22) Дата подачи заявки
2017.04.07(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)**(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ ИНГИБИТОРОМ ANGPTL8 И ИНГИБИТОРОМ ANGPTL3**(31) **62/319,980; 62/453,110**(32) **2016.04.08; 2017.02.01**(33) **US**(43) **2019.03.29**(86) **PCT/US2017/026679**(87) **WO 2017/177181 2017.10.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Громада Джеспер, Гусарова Виктория,
Мерфи Эндрю Дж. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) REN ZHANG: "The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking", OPEN BIOLOGY, vol. 6, no. 4, 1 April 2016 (2016-04-01), page 150272, XP055387866, DOI: 10.1098/rsob.150272 page 2, right-hand column - page 3, right-hand column page 8, left-hand column

ZHIYAO FU ET AL: "Alipasin/Angptl8 monoclonal antibody lowers mouse serum triglycerides involving increased postprandial activity of the cardiac lipoprotein lipase", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, no. 1, 21 December 2015 (2015-12-21), XP055360939, DOI: 10.1038/srepl8502 page 5; figures 1-4

WO-A1-2012174178

WO-A1-2017027316

HANSON ROBERT L ET AL: "The Arg59Trp variant in ANGPTL8 (betatrophin) is associated with total and HDL-cholesterol in American Indians and Mexican Americans and differentially affects cleavage of ANGPTL3", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 118, no. 2, 19 April 2016 (2016-04-19), pages 128-137, XP029548394, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2016.04.007 the whole document

JORGE F. HALLER ET AL: "ANGPTL8 requires ANGPTL3 to inhibit lipoprotein lipase and plasma triglyceride clearance", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 58, no. 6, 1 June 2017 (2017-06-01), pages 1166-1173, XP055387875, US ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/jlr.M075689 the whole document

(57) В настоящем изобретении предложены способы лечения пациентов, страдающих гиперлипидемией, где пациент не отвечает на, не поддается надлежащему контролю или не переносит лечение с применением стандартной липид-модифицирующей терапией. Способы согласно изобретению обеспечивают снижение по меньшей мере одного липидного показателя у пациента посредством введения терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфично связываются с ангиопоэтин-подобным белком 8 (ANGPTL8), в комбинации с терапевтически эффективным количеством антитела, которое специфично связывается с ангиопоэтин-подобным белком 3 (ANGPTL3). Комбинация антитела против ANGPTL8 с антителом против ANGPTL3 может применяться при лечении таких заболеваний, как гиперхолестеринемия, в том числе семейная гиперхолестеринемия (FH), как гeCG, так и гоCG, а также гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии и дислипидемии, в том числе гипертриглицеридемии, хиломикронемии, и для профилактики или лечения заболеваний или нарушений, при которых нарушенный метаболизм липидов является фактором риска, таких как сердечно-сосудистые заболевания.

B1**040479****040479 B1**

Сведения о последовательностях

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством отсылки. Указанная копия ASCII, созданная 7 апреля 2017 года, имеет название SequenceList_25PCT.txt и размер 18447 байтов.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области терапевтического лечения заболеваний и нарушений, которые связаны с повышенными уровнями липидов и липопротеинов. В частности, изобретение относится к применению ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) в комбинации с ингибитором ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) для лечения пациентов с гиперхолестеринемией и подобными состояниями.

Уровень техники

Гиперлипидемия - общий термин, который охватывает заболевания и нарушения, характеризующиеся или связанные с повышенными уровнями липидов и/или липопротеинов в крови. Гиперлипидемии включают гиперхолестеринемию,

гипертриглицеридемию, комбинированную гиперлипидемию и повышенный липопротеин а (Lp(a)). Конкретной наиболее распространенной формой гиперлипидемии во многих популяциях является гиперхолестеринемия.

Гиперхолестеринемия, в особенности повышение уровней холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (ХЛПНП), представляет наибольший риск развития атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС) (Sharrett et al., 2001, Circulation 104:1108-1113). Холестерин липопротеинов низкой плотности идентифицирован как основная мишень гипохолестеринемической терапии и принят в качестве действительного суррогатного терапевтического конечного показателя. Многочисленные исследования продемонстрировали, что снижение уровней ХЛПНП снижает риск ИБС с сильной прямой взаимосвязью между уровнями ХЛПНП и событиями ИБС; на каждый 1 ммоль/л снижения (~40 мг/дл) ХЛПНП, смертность и количество осложнений от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) снижаются на 22%. Снижение ХЛПНП приводит к уменьшению числа событий, причем сравнение данных при интенсивном и стандартном лечении статинами показывает, что чем ниже уровень ХЛПНП, тем лучше результат у пациентов с очень высоким сердечно-сосудистым риском (CV).

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) - наследственное нарушение обмена липидов, которое провоцирует у человека преждевременное развитие тяжелого сердечно-сосудистого заболевания (ССЗ) (Kolanosky et al., (2008), Am J Cardiology, 102 (11):1438-1443). СГ может быть аутосомно-доминантным или аутосомно-рецессивным заболеванием, которое вызвано мутациями рецептора липопротеинов низкой плотности (РЛПНП), или по меньшей мере в 3 разных генах, которые кодируют белки, участвующие в печеночном клиренсе ХЛПНП, и могут вызывать СГ. Примеры таких нарушений включают мутации в гене, кодирующем рецептор ЛПНП (РЛПНП), который удаляет ХЛПНП из кровотока, и в гене аполипопротеина (Аpo)В, который является главным белком частицы ЛПНП. Во всех случаях СГ характеризуется накоплением ХЛПНП в плазме с рождения и последующим развитием сухожильных ксантом, ксантелазм, атером и ССЗ. СГ можно классифицировать как гетерозиготный СГ (геСГ) или гомозиготный СГ (гоСГ), в зависимости от того, имеется ли у субъекта генетическое нарушение в одной (гетерозиготное) или обеих (гомозиготное) копиях вовлеченного гена.

Существующие на сегодняшний день ХЛПНП-понижающие лекарственные средства включает статины, ингибиторы абсорбции холестерина, фибраты, ниацин и секвестранты желчных кислот. Статины являются часто назначаемым лечением для понижения ХЛПНП. Однако, несмотря на доступность таких гиполипидемических терапий, многие пациенты с высоким риском не достигают своего рекомендуемого целевого уровня ХЛПНП (Gitt et al., 2010, Clin Res Cardiol 99(11):723-733). Пациентам, которым не удается достигнуть рекомендуемого целевого уровня ХЛПНП, несмотря на применение доступной липид-модифицирующей терапии (ЛМТ), иногда назначают механическое удаление ХЛПНП с помощью афереза липопротеинов (например, афереза ЛПНП).

Впрочем, у пациентов, которые не добиваются целевого уровня ХЛПНП, несмотря на применение оптимизированной схемы ЛМТ, могут быть эффективны альтернативные ХЛПНП-понижающие терапии или применение комбинации терапевтических средств, таких как средства и схемы, описанные в настоящей заявке.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения предложены способы лечения пациентов, страдающих гиперлипидемией, путем введения терапевтически эффективного количества ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) в комбинации с терапевтически эффективным количеством ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3).

В одном варианте осуществления гиперлипидемия является семейной гиперлипидемией или приобретенной гиперлипидемией.

В одном варианте осуществления гиперлипидемия выбрана из группы, состоящей из гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии или гиперхиломикронемии.

В одном варианте осуществления семейная гиперлипидемия является гиперхолестеринемией, вы-

бранной из группы, состоящей из гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (ГеСГ) и гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (ГоСГ).

В одном варианте осуществления приобретенная гиперлипидемия является следствием чрезмерного употребления алкоголя, ожирения, побочного действия лекарственных средств (например, гормонов или стероидов), диабета, заболевания почек, гипофункции щитовидной железы или беременности.

В одном варианте осуществления ингибитором ANGPTL8 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8, включает определяющие комплементарность области (CDR-области) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и CDR-области варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 5.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8, включает CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8, включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL8 вводят пациенту подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления ингибитором ANGPTL3 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3.

В одном варианте осуществления антителом ANGPTL3 является эвинакумаб.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3, включает определяющие комплементарность области (CDR-области) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и CDR-области варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3, включает CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3, включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления антитело ANGPTL3 вводят пациенту подкожно или внутривенно.

Во втором аспекте изобретения предложены способы снижения уровня по меньшей мере одного липидного показателя у пациента, страдающего нарушением или состоянием, характеризуемым в том числе повышенными уровнями липидов или липопротеинов, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества комбинации ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) и ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3).

В одном варианте осуществления нарушением или состоянием является гиперлипидемия, выбранная из группы, состоящей из семейной гиперлипидемии и приобретенной гиперлипидемии.

В одном варианте осуществления нарушением или состоянием является гиперлипидемия, выбранная из группы, состоящей из гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии или гиперхиломикронемии.

В одном варианте осуществления семейная гиперлипидемия является гиперхолестеринемией, выбранной из группы, состоящей из гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (ГеСГ) и гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (ГоСГ).

В одном варианте осуществления приобретенная гиперлипидемия является следствием чрезмерного употребления алкоголя, ожирения, побочного действия лекарственных средств (например, гормонов или стероидов), диабета, заболевания почек, гипофункции щитовидной железы или беременности.

В одном варианте осуществления гипертриглицеридемия, поддающаяся лечению с применением способов изобретения, включает семейную комбинированную гиперлипидемию, семейную дисбеталипопротеинемию, семейную гипертриглицеридемию, тяжелую хиломикронемию и семейный дефицит липопротеинлипазы.

В одном варианте осуществления ингибитором ANGPTL8 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8, включает определяющие комплементарность области (CDR-области) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и CDR-области варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 5.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8, включает CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL8, включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL8 вводят пациенту подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления ингибитором ANGPTL3 является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3.

В одном варианте осуществления антителом к ANGPTL3 является эвинакумаб.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3, включает определяющие комплементарность области (CDR-области) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и CDR-области варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3, включает CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ANGPTL3, включает HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления антитело к ANGPTL3 вводят пациенту подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 вводят параллельно или последовательно.

В одном варианте осуществления ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 вводят в терапевтически эффективных концентрациях в отдельных фармацевтических композициях или включают в одну фармацевтическую композицию.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложены способы лечения гиперлипидемии у пациентов, которые не отвечают, не поддаются надлежащему контролю или не переносят лечение с применением стандартной липид-модифицирующей терапии.

Терапевтические способы настоящего изобретения приводят к снижению уровней липопротеинов в сыворотке до диапазона нормальных и приемлемых значений и в таком виде могут обеспечивать снижение риска развития атеросклероза или ишемической болезни сердца.

В одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения пациента, страдающего гиперхолестеринемией, где пациент не отвечает на, не поддается контролю или не переносит лечение с применением стандартной липид-модифицирующей терапии, где способ включает лечение пациента комбинацией ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) и ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3).

В одном варианте осуществления изобретения предложено введение одной или более доз ингибитора ANGPTL8 в комбинации с одной или более дозами ингибитора ANGPTL3 пациенту, который проходит или проходил лечение с применением стандартной липид-модифицирующей терапии, но не отвечал на такую терапию. Введение комбинации ингибитора ANGPTL8 с ингибитором ANGPTL3 пациенту приводит к снижению уровня по меньшей мере одного липопротеина в сыворотке пациента и, следовательно, уменьшает или устраняет необходимость в лечении пациента с применением стандартной гиполлипидемической терапии.

В четвертом аспекте способы настоящего изобретения включают отбор пациента с гиперхолестеринемией, который проходит или проходил лечение с применением стандартной гиполлипидемической терапии и который не отвечает на, не поддается контролю или не переносит такую терапию, и введение одной или более доз антитела ANGPTL8 в комбинации с одной или более дозами антитела ANGPTL3 пациенту со снижением уровня по меньшей мере одного липопротеина в сыворотке пациента и после-

дующей заменой применения стандартной липид-модифицирующей терапии комбинированной терапией антителом ANGPTL8 плюс антителом ANGPTL3, с достижением целевого уровня липопротеинов.

Пациенты, которые проходят лечение или поддаются лечению с применением способов настоящего изобретения, включают, например, пациентов с гиперхолестеринемией, в том числе пациентов с семейной гиперхолестеринемией (СГ). В некоторых вариантах осуществления пациенты, проходят лечение или поддаются лечению с применением способов настоящего изобретения, являются пациентами, у которых диагностировали (или в иных обстоятельствах стало известно, что они имеют) гомозиготную СГ (гоСГ) или гетерозиготную СГ (геСГ), или которые подвергаются риску развития аномально высоких уровней липидов и/или липопротеинов, связанных с гомозиготной СГ (гоСГ) или гетерозиготной СГ (геСГ).

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, включающие ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3, для применения в лечении пациента, который не отвечает на, не поддается контролю или не переносит лечение с применением стандартной липид-модифицирующей терапии, такой как статин. Статин может быть выбран из группы, состоящей из аторвастатина (LIPITOR®), питавастатина (LIVALO®), ловастатина (Мевакор®), симвастатина (Зокор®), правастатина (PRAVACHOL®) флувастатина (Лескол®) и розувастатина (Крестор®). Другие типичные гиполипидемические средства, которые могут применяться у пациентов, страдающих гиперхолестеринемией, включают, без ограничения перечисленными, фибраты, ниацин, секвестранты желчных кислот, эзетимиб (ZETIA®), ломитапид (JUXTAPID®), фитостерины, орлистат (Ксеникал®).

Примеры ингибиторов ANGPTL8 или ингибиторов ANGPTL3, которые могут применяться в способах настоящего изобретения, включают, например, антитела против ANGPTL8 или против ANGPTL3, низкомолекулярные ингибиторы и ANGPTL8-связывающие молекулы или ANGPTL3-связывающие молекулы на основе каркасов.

В некоторых вариантах осуществления предполагается, что применение комбинации ингибитора ANGPTL8 с ингибитором ANGPTL3 может быть достаточно эффективным при снижении уровней липидов и/или липопротеинов в сыворотке, при этом доза стандартной липид-модифицирующей терапии может быть уменьшена для устранения любых неблагоприятных эффектов, или ее могут полностью отменить.

В одном варианте осуществления введение антитела ANGPTL8 в комбинации с антителом ANGPTL3 приводит к аддитивному эффекту при снижении уровня триглицеридов и общего холестерина в крови.

В одном варианте осуществления введение антитела ANGPTL8 в комбинации с антителом ANGPTL3 приводит к синергическому эффекту при снижении уровня триглицеридов и общего холестерина в крови.

В одном варианте осуществления введение антитела ANGPTL8 в комбинации с антителом ANGPTL3 приводит к снижению одного или более следующих показателей:

- (a) снижение уровня общего холестерина (ОХ) в сыворотке; или
- (b) снижение триглицеридов (ТГ) в сыворотке;

где снижение (a) и/или (b) определены относительно уровня ОХ или уровней триглицеридов в сыворотке пациента до или во время начала лечения с применением комбинации ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3.

В дополнительных определенных аспектах изобретение направлено на применение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) в комбинации с ингибитором ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) при лечении пациента, страдающего гиперлипидемией; изобретение направлено на применение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) в комбинации с ингибитором ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) при производстве лекарственного средства для лечения пациента, страдающего гиперлипидемией; и изобретение направлено на фармацевтическую композицию для лечения пациента, страдающего гиперлипидемией, где композиция включает терапевтически эффективное количество комбинации ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) и ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3). Другие варианты осуществления настоящего изобретения станут очевидными при ознакомлении со следующим подробным описанием.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано влияние Н4Н1276S (также называемого эвинакумабом), антитела против ANGPTL3, на уровни триглицеридов у мышей с нокаутом (КО) ANGPTL8 или у мышей дикого типа (WT) в день 2 или 8 после введения.

На фиг. 2 показано влияние Н4Н1276S на уровни общего холестерина у мышей с нокаутом ANGPTL8 или у мышей дикого типа в день 2 или 8 после введения.

На фиг. 3 показано влияние Н4Н1276S и Н4Н15341Р (также называемого "Н4Н15341", антитела против ANGPTL8) на уровни триглицеридов у гуманизированных мышей ANGPTL8 в дни 1, 4, 7 и 14 после введения.

На фиг. 4 показано влияние Н4Н1276S и Н4Н15341Р (антитела против ANGPTL8) на уровни общего холестерина у гуманизированных мышей ANGPTL8 в дни 1, 4, 7 и 14 после введения.

На фиг. 5 показаны результаты картирования эпитопов моноклональных антител против

ANGPTL8: PEPSCAN ELISA проводили с целью исследования связывания антител против ANGPTL8 с пептидами длиной 15 аминокислот с перекрывающимся участком протяженностью 14 аминокислот, охватывающим зрелый ANGPTL8.

На фиг. 6a, 6b, 6c, 6d, 6e и 6f показано, что антитело к ANGPTL8 устраняет ANGPTL3:ANGPTL8-опосредованное ингибирование ЛПЛ в результате стерического взаимодействия ЛПЛ с ингибирующим мотивом ANGPTL8. Фиг. 6a - аминокислотная последовательность ANGPTL8 (SEQ ID NO: 19), на которой показаны эпитопы восьми моноклональных антител, индуцированных против человеческого ANGPTL8. Фиг. 6b - триглицериды в сыворотке гуманизированных мышей ANGPTL8 за 7 дней до (предварительный забор крови) и через 2 дня после однократной инъекции 10 мг/мл восьми моноклональных антител, эпитопы которых показаны на фиг. 6a. Фиг. 6c - активность ЛПЛ, измеренная в среде культивирования клеток HEK283T, котрансфицированных ANGPTL3 и ANGPTL8, при обработке повышаемой концентрацией блокирующего антитела против ANGPTL8 (mAb7) или контрольного антитела. Фиг. 6d - анализ AlphaLISA для определения взаимодействия между ANGPTL3 и ANGPTL8, коэкспрессируемыми в клетках CHO-K1 без или с повышаемыми концентрациями блокирующего антитела против ANGPTL8 (mAb7) или контрольного антитела. Фиг. 6e - схема анализа TR-FRET с донорным красителем на N-конце ANGPTL8, вблизи от его ингибирующего мотива, и блокирующими и неблокирующими антителами, мечеными акцепторным красителем. Фиг. 6f - перенос энергии, измеренный в анализе TR-FRET между ANGPTL8 с N-концевой меткой и контрольным антителом, блокирующим антителом против ANGPTL8 (mAb7) или неблокирующим антителом против ANGPTL8 (mAb4) (n=3; ***p<0,0001). Эксперимент повторяли 3 раза с аналогичным результатом. Сокращения: BIO - биотин; CA - стрептавидин; mAb - моноклональное антитело; D - донорный краситель; A - акцепторный краситель.

Подробное описание

Перед тем как будет описано настоящее изобретение, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описанными условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Следует также понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не должна считаться ограничением, поскольку объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют такое же значение, под которым их обычно понимает специалист в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый в настоящей заявке термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, при использовании в настоящем описании выражение "приблизительно 100" включает в 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, могут использоваться при практическом осуществлении настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, указанные в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки для их описания.

Способы лечения гиперлипидемий.

Настоящее изобретение в целом относится к способам и композициям для снижения уровня липопротеинов, в частности триглицеридов и общего холестерина, у пациентов, страдающих гиперлипидемией, путем введения комбинации ингибитора ANGPTL8 с ингибитором ANGPTL3 пациенту, нуждающемуся в такой терапии. В некоторых вариантах осуществления комбинация ингибиторов применяется для лечения гиперхолестеринемии или гипертриглицеридемии у пациентов, которые не отвечают, не поддаются надлежащему контролю или не переносят стандартную липид-модифицирующую терапию (например, статины). В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение ингибитором ANGPTL8 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 может служить для снижения уровней липопротеинов у таких пациентов до приемлемого диапазона, что снижает риск развития атеросклероза, инсульта и других сердечно-сосудистых заболеваний. В некоторых вариантах осуществления описанные способы могут применяться для лечения пациентов, страдающих гиперхолестеринемией, включая гетерозиготную семейную гиперхолестеринемию (геСГ) и/или гомозиготную семейную гиперхолестеринемию (гоСГ), в том случае, если эти пациенты не отвечают, не поддаются надлежащему контролю или не переносят стандартную липид-модифицирующую терапию. В определенном варианте осуществления описанные способы могут применяться для лечения пациентов, страдающих или подверженных риску развития атеросклероза, ишемической болезни сердца, диабета, ожирения, панкреатита или метаболического синдрома.

При использовании в настоящей заявке термин "липопротеин" означает биомолекулярную частицу, содержащую и белок, и липид. Примеры липопротеинов включают, например, липопротеин низкой плотности (ЛПНП), липопротеин высокой плотности (ЛПВП), липопротеин очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеин средней плотности (ЛПСР) и липопротеин (a) (Lp(a)).

Настоящее изобретение, согласно некоторым вариантам осуществления, включает способы лечения пациентов, которые не отвечают, не поддаются надлежащему контролю или не переносят стандартную ли-

липид-модифицирующую терапию. При использовании в настоящей заявке конкретного пациента, который "не отвечает на, не поддается контролю или не переносят стандартную липид-модифицирующую терапию", определяет врач, помощник врача, специалист по лабораторной диагностике или другой медицинский работник на основе уровня одного или более липопротеинов (например, ХЛПНП и/или не-ХЛПВП), измеренного или иным образом определенного в сыворотке пациента после лечения стандартным липид-модифицирующим средством. Врач, помощник врача, специалист по лабораторной диагностике или другой медицинский работник также может определить у пациента непереносимость стандартных липид-модифицирующих терапий на основе профиля побочных эффектов стандартных липид-модифицирующих терапий, которые пациент может испытывать, включающих, без ограничения перечисленным, мышечные боли, болезненность или слабость (миалгию), головную боль, покраснение кожи, нарушения сна, спазмы в животе, вздутие, диарею, запор, сыпь, тошноту или рвоту. Пациент, который не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию, также может быть определен или может находиться под влиянием других факторов, таких как состояние здоровья близких родственников пациента, общие сведения медицинского характера, текущий статус терапевтического лечения, а также действующие или преобладающие целевые значения липопротеинов, принятые национальными медицинскими ассоциациями и группами врачей. Например, в некоторых случаях, если пациент проходит терапию с применением стандартного липид-модифицирующего средства и показывает уровень ХЛПНП больше или равный приблизительно 70 мг/дл, это указывает, что пациент "не отвечает или не поддается надлежащему контролю, или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию", и для него может быть эффективно лечение с применением терапий, описанных в настоящей заявке. В других случаях, если пациент проходит терапию с применением стандартного липид-модифицирующего средства и показывает уровень ХЛПНП больший или равный приблизительно 100 мг/дл, это указывает, что пациент "не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию", и для него может быть эффективно лечение с применением терапий, описанных в настоящей заявке. В некоторых случаях, если пациент проходит терапию с применением стандартного липид-модифицирующего средства и показывает уровень ХЛПНП больший или равный приблизительно 150, 200, 250, 300, 400 мг/дл или выше, это указывает, что пациент "не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию", и для него может быть эффективно лечение с применением терапий, описанных в настоящей заявке. В других случаях, соответствие или несоответствие определенного процентного снижения уровня ХЛПНП или не-ХЛПВП относительно уровня ХЛПНП или не-ХЛПВП пациента в определенной исходной точке ("исходного уровня") может использоваться для определения, отвечал ли пациент на стандартную липид-модифицирующую терапию, или нуждается ли такой пациент в дальнейшем лечении с применением способов и средств согласно настоящему изобретению. Например, снижение ХЛПНП или не-ХЛПВП меньше чем на 50% (например, меньше чем на 40%, меньше чем на 35%, меньше чем на 30%, меньше чем на 25% и т.д.) относительно исходного уровня может указывать на потребность в терапии с применением способов и средств согласно изобретению.

Например, в некоторых случаях, если пациент проходит терапию с применением стандартного липид-модифицирующего средства и показывает уровень триглицерида (ТГ) больший или равный приблизительно 150 мг/дл, это указывает, что пациент "не отвечает на или не поддается надлежащему контролю, или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию", и для него может быть эффективно лечение с применением терапий, описанных в настоящей заявке. В других случаях, если пациент проходит терапию с применением стандартного липид-модифицирующего средства и показывает уровень ТГ больший или равный приблизительно 200 мг/дл, это указывает, что пациент "не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию", и для него может быть эффективно лечение с применением терапий, описанных в настоящей заявке. В некоторых случаях, если пациент проходит терапию с применением стандартного липид-модифицирующего средства и показывает уровень ТГ больший или равный приблизительно 300, 400, 500, 750, 1000 мг/дл или выше, это указывает, что пациент "не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную липид-модифицирующую терапию", и для него может быть эффективно лечение с применением терапий, описанных в настоящей заявке.

В других случаях, соответствие или несоответствие определенного процентного снижения уровня ТГ, ОХ, ХЛПНП или не-ХЛПВП относительно уровня ТГ, ОХ, ХЛПНП или не-ХЛПВП пациента в конкретной исходной точке ("исходного уровня") может использоваться для определения, отвечал ли пациент на стандартную липид-модифицирующую терапию, или нуждается ли такой пациент в дальнейшем лечении с применением способов и средств согласно настоящему изобретению. Например, снижение ТГ, ОХ, ХЛПНП или не-ХЛПВП меньше чем на 50% (например, меньше чем на 40%, меньше чем на 35%, меньше чем на 30%, меньше чем на 25% и т.д.) относительно исходного уровня может указывать на потребность в терапии с применением способов и средств согласно изобретению.

Настоящее изобретение, таким образом, включает способы лечения, включающие введение одной или более доз ингибитора ANGPTL8 в комбинации с одной или более дозами ингибитора ANGPTL3 пациенту, в результате чего у пациента после лечения уровни общего холестерина, ТГ, ХЛПНП и/или не-ХЛПВП значительно снижаются в числовом выражении. Например, настоящее изобретение включает

терапевтические способы, включающие введение одной или более доз ингибитора ANGPTL8 и одной или более доз ингибитора ANGPTL3 пациенту, который проходит стандартную липид-модифицирующую терапию, но не отвечает на такую терапию или не переносит такую терапию, где после получения одной или более доз ингибитора ANGPTL8 и одной или более доз ингибитора ANGPTL3 у пациента могут быть достигнуты нормальные уровни общего холестерина, ТГ, ХЛПНП или не-ХЛПНП. В некоторых случаях у пациента могут отменить стандартную липид-модифицирующую терапию, или стандартная липид-модифицирующая терапия может быть продолжена, но может применяться в более низких дозах и может применяться в комбинации с ингибитором ANGPTL8 и ингибитором ANGPTL3 для достижения и/или поддержания конкретного целевого уровня липопротеина. В альтернативе пациенту могут назначать стандартную липид-модифицирующую терапию в нормальной предписанной дозе, но при этом частота введения липид-модифицирующей терапии может быть уменьшена, если стандартную липид-модифицирующую терапию предполагают применять в сочетании с комбинацией ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3. В некоторых случаях необходимость в лечении с применением стандартной липид-модифицирующей терапии у пациента для достижения и/или поддержания конкретного целевого уровня липопротеина можно полностью исключить после введения одной или более доз ингибитора ANGPTL8 в сочетании с ингибитором ANGPTL3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение включает способы уменьшения или устранения необходимости стандартной липид-модифицирующей терапии, где способы включают отбор пациента с гиперлипидемией (например, гиперхолестеринемией или гипертриглицеридемией), который проходил лечение с применением липид-модифицирующей терапии в течение последнего месяца, последних 2 месяцев, последних 3 месяцев, последних 4 месяцев, последних 5 месяцев, последних 6 месяцев или в течение более длительного периода, и введение пациенту одной или более доз ингибитора ANGPTL8 в комбинации с ингибитором ANGPTL3. Способы согласно этому аспекту изобретения приводят к снижению уровня по меньшей мере одного липопротеина в сыворотке пациента и, следовательно, позволяют уменьшить или исключить необходимость лечения пациента с применением стандартной липид-модифицирующей терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения после введения одной или более доз ингибитора ANGPTL8 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 уровень ХЛПНП в сыворотке пациента снижается до уровня меньше определенного значения (например, меньше 100 мг/дл или меньше 70 мг/дл), или уровень общего холестерина снижается до определенного уровня (например, меньше 200 мг/дл или меньше 150 мг/дл), или уровень ТГ снижается до определенного уровня (например, меньше 200 мг/дл или меньше 150 мг/дл).

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент, который поддается лечению с применением способов согласно настоящему изобретению, имеет гиперхолестеринемию (например, концентрацию ХЛПНП в сыворотке больше или равную 70 мг/дл, или концентрацию ХЛПНП в сыворотке больше или равную 100 мг/дл). Согласно некоторым вариантам осуществления пациент, который поддается лечению с применением способов согласно настоящему изобретению, имеет гипертриглицеридемию (например, концентрацию ТГ в сыворотке больше или равную 150 мг/дл или концентрацию ТГ в сыворотке больше или равную 200 мг/дл). В некоторых вариантах осуществления гиперхолестеринемия у пациента не поддается надлежащему контролю с применением стандартной липид-модифицирующей терапии, например терапии статинами. Например, настоящее изобретение включает способы лечения пациента, который не отвечает на, не поддается надлежащему контролю или не переносит терапию с применением стандартной липид-модифицирующей терапии, такой как статин, или который имеет гиперхолестеринемию, которая не поддается надлежащему контролю при ежедневном введении дозы статина, выбранного из группы, состоящей из аторвастатина (включая аторвастатин+эзетимиб), розувастатина, церивастатина, питавастатина, флувастатина, ловастатина, симвастатина (включая симвастатин+эзетимиб), правастатина и их комбинаций. Настоящее изобретение также включает способы снижения холестерина, ТГ, ХЛПНП или не-ХЛПНП у пациента с гиперхолестеринемией или гипертриглицеридемией, который демонстрирует непереносимость статинов или который в ином случае испытывает неблагоприятную или нежелательную реакцию(и) на терапию статинами (например, боль в скелетных мышцах, ломота, слабость или судороги (например, миалгию, миопатию, рабдомиолиз и т.д.)).

Отбор пациента.

Настоящее изобретение включает способы и композиции, применимые для лечения пациентов, которые страдают гиперлипидемией, которые не отвечают на, не поддаются контролю, или не переносят терапию с применением стандартной липид-модифицирующей терапии. Пациенты, которые поддаются лечению с применением способов согласно настоящему изобретению, могут также демонстрировать один или более дополнительных критериев отбора. Например, пациент может быть отобран для лечения с применением способов согласно настоящему изобретению, если пациент имеет диагноз или идентифицирован как подвергающийся риску развития состояния гиперхолестеринемии, такой как, например, гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия (геСГ), гомозиготная семейная гиперхолестеринемия (гоСГ), аутосомно-доминантная гиперхолестеринемия, аутосомно-рецессивная гиперхолестеринемия (АРГ, например АРГ, ассоциированная с мутациями в LDLRAP1), а также число новых случаев гиперхолестеринемии, которое отличается от семейной гиперхолестеринемии (не-СГ). Диагноз семейной гипер-

холестеринемии (например, геСГ или гоСГ) может быть поставлен с помощью генотипирования и/или клинических критериев. Для пациентов, которые не были генотипированы, клинический диагноз может быть основан на критериях Саймона Брума с критериями определенного СГ или ВОЗ/голландские критерии Dutch Lipid Network с оценкой по шкале >8 пунктов.

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент может быть отобран на основе ишемической болезни сердца (ИБС) в анамнезе. При использовании в настоящей заявке "ИБС в анамнезе" (или "подтвержденной ИБС в анамнезе") включает одно или более следующего: (i) острый инфаркт миокарда (ИМ); (ii) безболевой ИМ; (iii) нестабильную стенокардию; (iv) процедуру коронарной реваскуляризации (например, чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) или аортокоронарное шунтирование (АКШ)); и/или (v) клинически значимую ИБС, диагностированную при исследовании инвазивным или неинвазивным методом (таким как коронарная ангиография, тест с нагрузкой при использовании беговой дорожки, стресс-эхокардиографию или радиоизотопную визуализацию).

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент может быть отобран на основе некоронарного сердечно-сосудистого заболевания ("НКГ ССЗ"). При использовании в настоящей заявке "НКГ ССЗ" включает одно или более следующего:

- (i) подтвержденный предыдущий ишемический инсульт с очаговыми ишемическими неврологическими симптомами, который сохранялся больше 24 ч, который рассматривали как ишемический инсульт атеротромботического генеза;
- (ii) заболевание периферических артерий;
- (iii) аневризму брюшной аорты;
- (iv) атеросклеротический стеноз почечной артерии; и/или
- (v) болезнь сонных артерий (транзиторные ишемические атаки или >50% обструкция сонной артерии).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пациент может быть отобран на основе наличия одного или нескольких дополнительных факторов риска, таких как, например, (i) подтвержденная умеренная хроническая болезнь почек (ХБП), определенная $30 \leq eGFR < 60$ мл/мин/1,73 м² в течение 3 месяцев или больше; (ii) сахарный диабет 1-го типа или 2-го типа с или без повреждения поражаемых органов (например, ретинопатии, нефропатии, микроальбуминурии); (iii) вычисленный риск развития фатального ССЗ за 10 лет $\geq 5\%$ (ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidemias, Conroy et al., 2003, Eur. Heart J. 24:987-1003).

Согласно некоторым вариантам осуществления пациент может быть отобран на основе наличия одного или более дополнительных факторов риска, выбранных из группы, состоящей из возраста (например, старше 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 лет), расы, национальной принадлежности, пола (мужчина или женщина), привычек, связанных с выполнением физических упражнений (например, постоянное выполняет физические упражнения, не выполняет физические упражнения), другие предшествующие патологические состояния (например, диабет II типа, повышенное артериальное давление и т.д.), и текущий статус лечения (например, текущий прием бета-блокаторов, ниацина, эзетимиба, фибратов, омега-3 жирных кислот, секвестрантов желчных кислот и т.д.).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения субъект, который поддается лечению с применением способов согласно изобретению, демонстрирует повышенный уровень одного или более воспалительных маркеров. Любой маркер системного воспаления может применяться в рамках настоящего изобретения. Подходящие воспалительные маркеры включают, без ограничения, С-реактивный белок, цитокины (например, IL-6, IL-8 и/или IL-17) и молекулы клеточной адгезии (например, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, LFA-2, VCAM-1, NCAM и PECAM).

Согласно настоящему изобретению пациенты могут быть отобраны на основе комбинации одного или более предыдущих критериев отбора или терапевтических характеристик. Например, согласно некоторым вариантам осуществления пациент, подходящий для лечения с применением способов настоящего изобретения, может быть также отобран на основе присутствия геСГ или не-СГ в комбинации с: (i) подтвержденной ИБС в анамнезе, (ii) НКГ ССЗ, и/или (iii) сахарным диабетом с повреждением поражаемого органа; такие пациенты также могут быть отобраны на основе концентрации ХЛПНП в сыворотке больше или равной 70 мг/дл.

Согласно некоторым другим вариантам осуществления, пациент, подходящий для лечения с применением способов настоящего изобретения, в дополнение к наличию гиперхолестеринемии, которая не поддается надлежащему контролю с применением терапевтической схемы с ежедневным введением средней дозы статина, может быть также отобран по наличию геСГ или не-СГ без ИБС или НКГ ССЗ, но при этом иметь любое из: (i) вычисленного риска развития фатального ССЗ за 10 лет >5%; или (ii) сахарного диабета без повреждения поражаемого органа; такие пациенты также могут быть отобраны по концентрации ХЛПНП в сыворотке больше или равной 100 мг/дл.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, субъект, который поддается лечению с применением способов изобретения, является субъектом, который имеет синдром семейной хиломикронемии (ССХ; также известный как дефицит липопротеинлипазы).

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, субъект, который поддается лечению с применением способов изобретения, является субъектом, который проходит или недавно проходил аферез липопротеинов (например, в течение последних шести месяцев, в течение последних 12 недель, в течение последних 8 недель, в течение последних 6 недель, в течение последних 4 недель, в течение последних 2 недель и т.д.).

Введение ингибитора ANGPTL8 плюс ингибитор ANGPTL3 в качестве дополнительной терапии

Настоящее изобретение включает способы лечения, где пациенту, который проходит или недавно проходил стандартную липид-модифицирующую терапию (например, статин), вводят ингибитор ANGPTL8 плюс ингибитор ANGPTL3 согласно конкретной дозе и частоте введения, и где ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 вводят в качестве дополнения к существующей ранее липид-модифицирующей терапии пациента (в соответствующих случаях), такого как дополнение к существующей ранее терапевтической схеме пациента с ежедневным применением статина.

Например, способы настоящего изобретения включают дополнительные терапевтические схемы, где ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 вводят в качестве дополнительной терапии к такой же стабильной терапевтической схеме с ежедневным введением статина (т.е. с такой же дозой статина), которую пациент получал до получения ингибиторов ANGPTL8 и ANGPTL3. В других вариантах осуществления ингибиторы ANGPTL8 и ANGPTL3 вводят в качестве дополнительной терапии к терапевтической схеме введения статина, включающей статин в количестве, которое больше или меньше, чем доза статина, которую пациент получал до получения ингибиторов ANGPTL8 и ANGPTL3. Например, после начала терапевтической схемы, включающей ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3, вводимые с определенной частотой введения и дозами, суточная доза статина, вводимого или назначенного пациенту, может: (а) оставаться такой же, (б) увеличиваться или (с) уменьшаться (например, дозу могут повышать или снижать) по сравнению с суточной дозой статина, которую пациент получал до терапевтической схемы с применением ингибиторов ANGPTL8 и ANGPTL3, в зависимости от терапевтических потребностей пациента.

Терапевтическая эффективность.

Способы настоящего изобретения могут приводить к снижению уровней одного или более липидных компонентов в сыворотке, выбранных из группы, состоящей из общего холестерина, ХЛПНП, не-ХЛПВП, ApoB100, ХЛПОНП, триглицерида (ТГ), Lp(a) и ремнантного холестерина. Например, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения введение ингибитора ANGPTL8 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 подходящему субъекту приведет к среднему процентному снижению холестерина липопротеинов низкой плотности (ХЛПНП) в сыворотке относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 25, 30, 40, 50, 60% или больше; среднему процентному снижению ApoB100 относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 25, 30, 40, 50, 60% или больше; среднему процентному снижению не-ХЛПВП относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 25, 30, 40, 50, 60% или больше; среднему процентному снижению общего холестерина относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 10, 15, 20, 25, 30, 35% или больше; среднему процентному снижению ХЛПОНП относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30% или больше; среднему процентному снижению триглицеридов относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35% или больше; и/или среднему процентному снижению Lp(a) относительно исходного уровня по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25% или больше.

Ингибиторы ANGPTL8 и ингибиторы ANGPTL3.

Способы настоящего изобретения включают введение пациенту терапевтической композиции, включающей ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3.

Ингибиторы ANGPTL8.

При использовании в настоящей заявке "ингибитор ANGPTL8" является любым средством, которое связывается с или взаимодействует с человеческим ANGPTL8 и ингибирует нормальную биологическую функцию ANGPTL8 *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры классов ингибиторов ANGPTL8 включают низкомолекулярные антагонисты ANGPTL8, ингибиторы экспрессии или активности ANGPTL8 на основе нуклеиновых кислот (например, мiРНК или антисмысловые), молекулы на основе пептидов, которые специфично взаимодействуют с ANGPTL8 (например, пептитела), молекулы рецепторов, которые специфично взаимодействуют с ANGPTL8, белки, включающие лиганд-связывающую часть рецептора ЛПНП, ANGPTL8-связывающее каркасные молекулы (например, дарпины, белки с повторами HEAT, белки с повторами ARM, белки с тетраатрикопептидными повторами, конструкции каркасов на основе фибронектина и другие каркасы на основе природных белков с повторами и т.д. (см., например, Voersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, и ссылки, цитируемые в этой публикации)), а также аптамеры против ANGPTL8 или их части. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы ANGPTL8, которые могут применяться в рамках настоящего изобретения, являются антителами против ANGPTL8 или антигенсвязывающими фрагментами антител, которые специфично связывают человеческий ANGPTL8.

Термин "человеческий ангиопоэтин-подобный белок 8" или "человеческий ANGPTL8", или

"hANGPTL8", или "ANGPTL8" также называют "липазином", "RIFL" или "бетатрофином". Человеческий ANGPTL8 также относится к ANGPTL8, имеющему белковую последовательность, показанную в аминокислотах 1-177 SEQ ID NO: 9, или его биологически активному фрагменту, а также к показанному в GenBank NP_061157.3 (SEQ ID NO: 19)). Активность ANGPTL8, которая может быть нейтрализована, ингибирована, блокирована, устранена, снижена или нарушена антителом или его антигенсвязывающим фрагментом согласно изобретению, включает, без ограничения перечисленным, ингибирование активности ЛПЛ или снижение уровней триглицеридов *in vivo* и т.п.

Ингибиторы ANGPTL3.

При использовании в настоящей заявке "ингибитор ANGPTL3" является любым средством, которое связывается с или взаимодействует с человеческим ANGPTL3 и ингибирует нормальную биологическую функцию ANGPTL3 *in vitro* или *in vivo*. Неограничивающие примеры классов ингибиторов ANGPTL3 включают низкомолекулярные антагонисты ANGPTL3, ингибиторы экспрессии или активности ANGPTL3 на основе нуклеиновой кислоты (например, миРНК или антисмысловой), молекулы на основе пептидов, которые специфично взаимодействуют с ANGPTL3 (например, пептитела), молекулы рецепторов, которые специфично взаимодействуют с ANGPTL3, ANGPTL3-связывающие каркасные молекулы (например, дарпины, белки с повторами HEAT, белки с повторами ARM, белки с тетрапептидными повторами, конструкции каркасов на основе фибронектина и другие каркасы на основе природных белков с повторами и т.д. (см., например, Voersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, и ссылки, цитируемые в этой публикации)), а также аптамеры против ANGPTL3 или их части. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы ANGPTL3, которые могут применяться в рамках настоящего изобретения, являются антителами против ANGPTL3 или антигенсвязывающими фрагментами антител, которые специфично связывают человеческий ANGPTL3.

Термин "человеческий ангиопозтин-подобный белок 3" или "человеческий ANGPTL3" или "hANGPTL3" при использовании в настоящей заявке относится к ANGPTL3, имеющему последовательность аминокислот SEQ ID NO: 18 (см. также NCBI NP 055310), или его биологически активному фрагменту.

Термин "антитело" при использовании в настоящей заявке относится к молекулам иммуноглобулинов, содержащим четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также к их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в настоящем описании 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 обозначенную в настоящем описании 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 подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR-областей и четырех FR-областей, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR-области антитела против ANGPTL8 (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны человеческим последовательностям зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным образом. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена с помощью параллельного анализа двух или более CDR-областей.

Термин "антитело" при использовании в настоящей заявке также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобные включают любой природный, получаемый с помощью ферментов, синтетический или рекомбинантный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител с применением любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или генно-инженерные технологии рекомбинантных ДНК, включающие манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антител. Такие ДНК известны и/или легко доступны, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включающих, например, фаговые библиотеки антител), или могут быть синтезированы. ДНК можно секвенировать и модифицировать химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для соединения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или с целью введения кодонов, остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, анти-

тела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические средства (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охвачены термином "антигенсвязывающий фрагмент", используемым в настоящем описании.

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

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие примерные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут присутствовать в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно 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 примерных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть связаны непосредственно друг с другом, либо могут быть связаны полноразмерной или неполной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что обеспечивает гибкую или полугибкую связь между смежными переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае полноразмерных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфично связывать отдельный антиген или другой эпитоп на том же антигене. Любой формат мультиспецифичного антитела, включая примерные форматы биспецифичных антител, раскрытые в настоящем описании, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием стандартных методов, известных в данной области.

Константная область антитела важна для способности антитела связывать комплемент и опосредовать клеточную цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран в зависимости от необходимости в том, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

Термин "человеческое антитело" при использовании в настоящей заявке должен включать антитела, переменные и константные области которых получены из человеческих последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии.

Человеческие антитела согласно изобретению могут, тем не менее, включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*), например, в CDR-областях и, в частности, CDR3. Однако термин "человеческое антитело" при использовании в настоящей заявке не должен включать антитела, в которых CDR последовательности, полученные из зародышевой линии млекопитающего другого вида, такого как мышь, были перевиты на человеческие каркасные последовательности. Термин включает антитела, рекомбинантно полученные в организме млекопитающего, не относящегося к человеку, или в клетках млекопитающего, не относящегося к человеку. Термин не должен включать антитела, выделенные из или продуцируемые в организме человека.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" при использовании в настоящей заявке должен включать все человеческие антитела, которые были получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными методами, такие как антитела, экспрессированные с применением рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (подробно описанную ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (подробно описанной ниже), антитела, полученные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам человеческих иммуноглобулинов (см., 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. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и кон-

стантные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии. В некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, в случае применения животных, трансгенных по последовательностям человеческих Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хотя и получены из и являются родственными в отношении последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека, могут в естественных условиях не присутствовать в репертуаре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциированы с гетерогенностью шарнирной области. В одной форме молекула иммуноглобулина включает стабильную четырехцепочечную конструкцию массой примерно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, при этом образуется молекула массой приблизительно 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 изотипах интактных IgG зависит, без ограничения указанным, от структурных различий, связанных с изотипом шарнирной области антитела. Одиночная аминокислотная замена в шарнирной области человеческого IgG4 может приводить к существенному уменьшению образования второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнирной области человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной, C_H2 или C_H3 области, что может быть предпочтительным, например, при производстве, для повышения выхода требуемой формы антитела.

"Выделенное антитело" при использовании в настоящей заявке означает антитело, которое было идентифицировано и отделено от, и/или извлечено из, по меньшей мере одного компонента его естественного окружения. Например, в рамках настоящего изобретения "выделенным антителом" является антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере от одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело присутствует в естественных условиях или естественным образом продуцируется. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела являются антителами, которые были подвергнуты по меньшей мере одному этапу очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин "специфично связывает" и т.п. означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образуют комплекс с антигеном, который относительно стабилен при физиологических условиях. Способы определения, связывается ли антитело специфично с антигеном, известны в уровне техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т.п. Например, антитело, которое "специфично связывает" ANGPTL8 или "специфично связывает" ANGPTL3 при использовании в рамках настоящего изобретения включает антитела, которые связывают ANGPTL8 или ANGPTL3, или их часть с K_D меньше чем приблизительно 1000 нМ, меньше чем приблизительно 500 нМ, меньше чем приблизительно 300 нМ, меньше чем приблизительно 200 нМ, меньше чем приблизительно 100 нМ, меньше чем приблизительно 90 нМ, меньше чем приблизительно 80 нМ, меньше чем приблизительно 70 нМ, меньше чем приблизительно 60 нМ, меньше чем приблизительно 50 нМ, меньше чем приблизительно 40 нМ, меньше чем приблизительно 30 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 4 нМ, меньше чем приблизительно 3 нМ, меньше чем приблизительно 2 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ или меньше чем приблизительно 0,5 нМ, при измерении с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Выделенное антитело, которое специфично связывает человеческий ANGPTL8 или человеческий ANGPTL3, тем не менее, обладает перекрестной реактивностью в отношении других антигенов, таких как молекулы ANGPTL8 или молекулы ANGPTL3 из других видов (не относящихся к человеку).

Антитела против ANGPTL8 и против ANGPTL3, применимые в способах настоящего изобретения, могут включать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть с легкостью обнаружены при сравнении аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящей заявке, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из открытых баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает способы, включающие применение антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящей заявке, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных и/или CDR областях подвергнуты мутации с заменой на соответствующий остаток(ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или на соответствующий остаток(ки) другой человеческой последовательности зародышевой линии, или с консервативной аминокислотной заменой соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности указаны в на-

стоящей заявке в совокупности как "мутации зародышевой линии"). Средний специалист в данной области, используя в качестве исходных последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи, раскрытые в настоящей заявке, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые включают одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все каркасные и/или CDR остатки в доменах V_H и/или V_L подвергнуты мутации с обратной заменой на остатки, присутствующие в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только некоторые остатки подвергнуты мутации с обратной заменой на исходную последовательность зародышевой линии, например только мутантные остатки, присутствующие в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутантные остатки, присутствующие в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных и/или CDR остатка(ов) подвергнуты мутации с заменой на соответствующий остаток(ки) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено первоначально). Кроме того, антитела настоящего изобретения могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в каркасных и/или CDR областях, например, где некоторые отдельные остатки подвергнуты мутации с заменой на соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или подвергнуты мутации с заменой на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии. После получения, антител и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более требуемых свойств, таких как повышенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность и т.д. Применение антител и антигенсвязывающих фрагментов, полученных таким общим способом, включено в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также включает способы, включающие применение антител против ANGPTL8 и против ANGPTL3, включающих варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящей заявке, содержащие одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает применение антител против ANGPTL8 и против ANGPTL3, содержащих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами по сравнению с любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящей заявке.

Термин "поверхностный плазмонный резонанс" при использовании в настоящей заявке относится к оптическому явлению, которое позволяет исследовать взаимодействия в реальном времени посредством обнаружения изменений концентраций белка в матрице биосенсора, например, при использовании системы BIAcore™ (Biacore Life Sciences, подразделение GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Термин "K_D" при использовании в настоящей заявке относится к равновесной константе диссоциации определенного взаимодействия антигена-антитела.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим участком в варибельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь больше одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут оказывать разное биологическое действие. Эпитопы могут конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется в результате пространственного сближения аминокислот из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образованный смежными аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В некоторых случаях эпитоп может включать молекулы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Согласно некоторым вариантам осуществления, антитела против ANGPTL8 и против ANGPTL3, применяемые в способах настоящего изобретения, являются антителами со свойствами pH-зависимого связывания. При использовании в настоящей заявке выражение "pH-зависимое связывание" означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют "сниженное связывание с ANGPTL8 при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH" (в рамках настоящего описания оба выражения могут использоваться попеременно), или что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют "сниженное связывание с ANGPTL3 при кислотном pH по сравнению с нейтральным pH" (в рамках настоящего описания оба выражения могут использоваться попеременно). В качестве примера, антитела "со свойствами pH-зависимого связывания" включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются либо с ANGPTL8, либо с ANGPTL3 с более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислотном pH. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают ANGPTL8 или ANGPTL3 с по меньшей мере в 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или больше раз более высокой аффинностью при нейтральном pH, чем при кислотном pH.

Согласно данному аспекту изобретения, антитела против ANGPTL8 или антитела против ANGPTL3 со свойствами pH-зависимого связывания могут обладать одним или более аминокислотными изменениями по сравнению с исходным антителом против ANGPTL8 или исходным антителом против ANGPTL3. Например, антитело против ANGPTL8 или антитело против ANGPTL3 со свойствами pH-зависимого связывания может содержать одну или более гистидиновых замен или вставок, например, в одной или более CDR-областях исходного антитела против ANGPTL8 или исходного антитела против ANGPTL3. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения предложены способы, включающие введение антитела против ANGPTL8 и против антитела ANGPTL3, которое включает аминокислотные последовательности CDR (например, CDR-области тяжелой и легкой цепи), которые идентичны аминокислотным последовательностям CDR исходного антитела против ANGPTL8 или исходного антитела ANGPTL3, за исключением замены одной или более аминокислот в одной или более CDR-областях исходного антитела остатком гистидина. Антитела против ANGPTL8 или антитела против ANGPTL3 с pH-зависимым связыванием могут обладать, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более гистидиновыми заменами либо в одной CDR исходного антитела, либо распределенными по нескольким (например, 2, 3, 4, 5 или 6) CDR-областям исходного антитела против ANGPTL8 или исходного антитела против ANGPTL3. Например, настоящее изобретение включает применение антител против ANGPTL8 и антител против ANGPTL3 с pH-зависимым связыванием, включающих одну или более гистидиновых замен в HCDR1, одну или более гистидиновых замен в HCDR2, одну или более гистидиновых замен в HCDR3, одну или более гистидиновых замен в LCDR1, одну или более гистидиновых замен в LCDR2 и/или одну или более гистидиновых замен в LCDR3 исходного антитела против ANGPTL8 или исходного антитела против ANGPTL3.

При использовании в настоящей заявке выражение "кислотный pH" означает pH 6,0 или меньше (например, меньше чем приблизительно 6,0, меньше чем приблизительно 5,5, меньше чем приблизительно 5,0 и т.д.). Выражение "кислотный pH" включает значения pH приблизительно 6,0, 5,95, 5,90, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или меньше. При использовании в настоящей заявке выражение "нейтральный pH" означает pH от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

Неограничивающий пример антитела против ANGPTL8, которое может применяться в рамках настоящего изобретения, включает антитело против ANGPTL8, включающее три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR-области), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 1, и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR-области), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 5. В одном варианте осуществления антитело против ANGPTL8, которое может применяться в рамках настоящего изобретения, включает антитело против ANGPTL8, включающее HCDR1 SEQ ID NO: 2, HCDR2 SEQ ID NO: 3, HCDR3 SEQ ID NO: 4, LCDR1 SEQ ID NO: 6, LCDR2 SEQ ID NO: 7 и LCDR3 SEQ ID NO: 8. В одном варианте осуществления антитело против ANGPTL8, которое может применяться в рамках настоящего изобретения, включает антитело против ANGPTL8, включающее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 1/5.

Неограничивающий пример антитела против ANGPTL3, которое может применяться в рамках настоящего изобретения, включает эвинакумаб, который включает три определяющих комплементарность области тяжелой цепи (HCDR-области), содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID NO: 10, и три определяющих комплементарность области легкой цепи (LCDR-области), содержащиеся в варибельной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID NO: 14. Эвинакумаб включает HCDR1 SEQ ID NO: 11, HCDR2 SEQ ID NO: 12, HCDR3 SEQ ID NO: 13, LCDR1 SEQ ID NO: 15, LCDR2 SEQ ID NO: 16 и LCDR3 SEQ ID NO: 17. Эвинакумаб включает пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 10/14.

Получение человеческих антител.

Антитела против ANGPTL8 и антитела против ANGPTL3 могут быть получены согласно любому способу получения/выделения антител, известному в данной области. Например, антитела для применения в способах настоящего изобретения могут быть получены с помощью технологий гибридом, фагового дисплея, дрожжевого дисплея и т.д. Антитела для применения в способах настоящего изобретения могут быть, например, химерными антителами, гуманизированными антителами или полностью человеческими антителами.

Способы получения человеческих антител в трансгенных мышцах известны в уровне техники. Любые такие известные способы могут применяться в рамках настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфично связывают ANGPTL8 или ANGPTL3.

Например, при использовании технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, US 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals) или любого другого известного способа получения моноклональных антител сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к ANGPTL8 или ANGPTL3, имеющие варибельную область человеческого антитела и константную область мышинового антитела. Технология VELOCIM-

MUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит человеческие переменные области тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, в результате чего в ответ на антигенную стимуляцию мышь продуцирует антитело, включающее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Обычно мышь VELOCIMMUNE® иммунизируют представляющим интерес антигеном и лимфатические клетки (такие как В-клетки) выделяют у мыши, которая экспрессирует антитело. Лимфатические клетки можно подвергать слиянию с линией клеток миеломы, получая линии immortalized клеток гибридом, после чего такие клетки гибридом подвергают скринингу и производят отбор для идентификации линий клеток гибридом, которые продуцируют антитела, специфичные в отношении представляющего интерес антигена. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с константными областями требуемого изотипа тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок антитела может быть получен в клетке, такой как клетка CHO. В альтернативе ДНК, кодирующая антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, может быть выделена непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Антитела анализируют и отбирают по наличию требуемых свойств, включающих аффинность, селективность, эпитоп и т.д., при использовании стандартных методов, известных специалистам в данной области. Мышинные константные области затем заменяют требуемой человеческой константной областью с получением полностью человеческого антитела согласно изобретению, например IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированные. Хотя выбранная константная область может изменяться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности по отношению к мишени определяются переменной областью.

Как правило, антитела, которые могут применяться в способах настоящего изобретения, обладают высокой аффинностью, как описано выше, при измерении связывания с антигеном либо в иммобилизованной форме на твердой фазе, либо в фазе раствора. Мышинные константные области заменяют требуемыми человеческими константными областями с получением полностью человеческого антитела согласно изобретению. Хотя выбранная константная область может изменяться в зависимости от конкретного применения, характеристики высокоаффинного связывания антигена и специфичности по отношению к мишени определяются переменной областью.

Конкретные примеры человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, которые специфично связывают ANGPTL8, которые могут применяться в рамках способов настоящего изобретения, включают антитела или антигенсвязывающие белки, включающие шесть CDR-областей (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), включающей SEQ ID NO: 1/5.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против ANGPTL8 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут применяться в способах настоящего изобретения, включают определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4, 6, 7 и 8.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против ANGPTL8 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут применяться в способах настоящего изобретения, включают HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

Определенные примеры человеческих антител или антигенсвязывающих фрагментов антител, которые специфично связывают ANGPTL3, которые могут применяться в рамках способов настоящего изобретения, включают антитела или антигенсвязывающие белки, включающие шесть CDR-областей (HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из пары аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), включающей SEQ ID NO: 10/14.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут применяться в способах настоящего изобретения, включают определяющие комплементарность области тяжелой и легкой цепи (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12, 13, 15, 16 и 17.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые могут применяться в способах настоящего изобретения, включают HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Фармацевтические композиции и способы введения.

Настоящее изобретение включает способы, которые включают введение ингибитора ANGPTL8 пациенту в комбинации с ингибитором ANGPTL3, где ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 содержатся в одной или в разных фармацевтических композициях. Фармацевтические композиции согласно изобретению изготавливают с соответствующими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих лекарственных форм можно найти в справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Такие лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воска, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, 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. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Примерные фармацевтические композиции, включающие антитела против ANGPTL8 и/или антитела против ANGPTL3, которые могут применяться в рамках настоящего изобретения, включают любую из лекарственных форм, указанных в US 8,795,669 или в WO2013/166448 или WO2012/168491.

Различные системы доставки известны и могут применяться для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецепторно-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают, без ограничения перечисленными, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, абсорбции через эпителиальную или слизисто-кожную выстилку (например, через слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами.

Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению могут доставлять подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может легко найти применение шприц-ручка. Такая шприц-ручка может быть устройством многоразового или одноразового применения. В шприц-ручке многоразового применения, как правило, используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После полного введения содержащейся в картридже фармацевтической композиции и опорожнения картриджа, пустой картридж можно легко утилизировать и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого шприц-ручку можно применять повторно. В шприц-ручке одноразового применения нет сменного картриджа. Т.е. шприц-ручка одноразового применения предварительно заполнена фармацевтической композицией, находящейся в резервуаре внутри устройства. После израсходования содержащейся в резервуаре фармацевтической композиции все устройство утилизируют.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению могут использоваться различные шприц-ручки многоразового применения и автоинъекторные устройства доставки. Примеры включают, без ограничения перечисленными, 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), а также многие другие.

Примеры шприц-ручек одноразового применения, подходящих для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения перечисленными, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинъектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EP-IPEN (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 может использоваться насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления могут использоваться полимерные материалы; см.: Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В другом варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть помещена в непосредственной близости от мишени композиции, что потребует введения только части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в: Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 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 т.д. Такие инъекционные препараты могут быть изготовлены общеизвестными методами. Например, инъекционные препараты могут быть изготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антигена или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества, и так далее, которые можно использовать в комбинации с соответствующим солибилизирующим веществом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, (аддукт полиоксиэтилена (50 моль) и гидрогенизированного касторового масла)) и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут использоваться в комбинации с солибилизирующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Полученную таким образом инъекционную форму предпочтительно фасуют в подходящие ампулы.

Предпочтительно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, изготовлены в виде лекарственных форм в однократной дозе, подходящей для коррекции дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в однократной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, препараты для инъекций (ампулы), суппозитории и т.д.

Доза.

Количество ингибитора ANGPTL8 (например, антигена против ANGPTL8) или ингибитора ANGPTL3 (например, антигена против ANGPTL3), вводимое субъекту согласно способам настоящего изобретения, обычно является терапевтически эффективным количеством. При использовании в настоящей заявке фраза "терапевтически эффективное количество ингибитора ANGPTL8" означает дозу ингибитора ANGPTL8, в случае введения в комбинации с ингибитором ANGPTL3, которая приводит к подающемуся обнаружению снижению (по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75% или больше относительно исходного уровня) одного или более показателей, выбранных из группы, состоящей из общего холестерина, ХЛПНП, ApoB100, не-ХЛПВП, ХЛПОНП, триглицеридов, Lp(a) и ремнантного холестерина, или количество, которое уменьшает или устраняет потребность пациента в других терапевтических воздействиях, таких как аферез липопротеинов, или которое уменьшает нормализованную для пациента скорость афереза.

В случае антигена против ANGPTL8 терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 0,05 до приблизительно 600 мг, например приблизительно 0,05, приблизительно 0,1, приблизительно 1,0, приблизительно 1,5, приблизительно 2,0, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 230, приблизительно 240, приблизительно 250, приблизительно 260, приблизительно 270, приблизительно 280, приблизительно 290, приблизительно 300, приблизительно 310, приблизительно 320, приблизительно 330, приблизительно 340, приблизительно 350, приблизительно 360, приблизительно 370, приблизительно 380, приблизительно 390, приблизительно 400, приблизительно 410, приблизительно 420, приблизительно 430, приблизительно 440, приблизительно 450, приблизительно 460, приблизительно 470, приблизительно 480, приблизительно 490, приблизительно 500, приблизительно 510, приблизительно 520, приблизительно 530, приблизительно 540, приблизительно 550, приблизительно 560 мг, приблизительно 570 мг, приблизительно 580 мг, приблизительно 590 или приблизительно 600 мг антигена против ANGPTL8. Согласно некоторым примерам осуществления настоящего изобретения терапевтически эффективное количество антигена против ANGPTL8 составляет 75, 150, или 300 (например, в случае алирокумаба), или 140, или 420 мг (например, в случае эволокумаба). Другие дозы ингибиторов ANGPTL8 будут очевидны средним специалистам в данной области и предусмотрены в рамках настоящего изобретения.

Количество антигена против ANGPTL8, содержащееся в отдельных дозах, может быть выражено в миллиграммах антигена на килограмм массы тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антиген против ANGPTL8 может быть введено пациенту в дозе от приблизительно 0,0001 до приблизительно 10 мг/кг массы тела пациента.

Количество ингибитора ANGPTL3 (например, антигена против ANGPTL3), вводимое субъекту согласно способам настоящего изобретения, обычно является терапевтически эффективным количеством. При использовании в настоящей заявке фраза "терапевтически эффективное количество ингибитора ANGPTL3" означает дозу ингибитора ANGPTL3, которая, в случае присутствия в комбинации с ингибитором ANGPTL8, приводит к подающемуся обнаружению снижению (по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75% или больше относительно исходного уровня) одного или более показателей, выбранных из группы, состоящей из общего холестерина, ХЛПНП, ApoB100, не-ХЛПВП, ХЛПОНП, триглицеридов, Lp(a) и ремнантного холестерина, или количество, ко-

торое предотвращает или ослабляет атеросклероз у субъекта (как описано в другом месте настоящей заявки).

В случае антитела против ANGPTL3 терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 0,05 до приблизительно 600 мг, например, приблизительно 0,05, приблизительно 0,1, приблизительно 1,0, приблизительно 1,5, приблизительно 2,0, приблизительно 10, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 60, приблизительно 70, приблизительно 80, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 110, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 160, приблизительно 170, приблизительно 180, приблизительно 190, приблизительно 200, приблизительно 210, приблизительно 220, приблизительно 230, приблизительно 240, приблизительно 250, приблизительно 260, приблизительно 270, приблизительно 280, приблизительно 290, приблизительно 300, приблизительно 310, приблизительно 320, приблизительно 330, приблизительно 340, приблизительно 350, приблизительно 360, приблизительно 370, приблизительно 380, приблизительно 390, приблизительно 400, приблизительно 410, приблизительно 420, приблизительно 430, приблизительно 440, приблизительно 450, приблизительно 460, приблизительно 470, приблизительно 480, приблизительно 490, приблизительно 500, приблизительно 510, приблизительно 520, приблизительно 530, приблизительно 540, приблизительно 550, приблизительно 560, приблизительно 570, приблизительно 580, приблизительно 590 или приблизительно 600 мг антитела против ANGPTL3. Другие дозы ингибиторов ANGPTL3 будут очевидны средним специалистам в данной области и предусмотрены в рамках настоящего изобретения.

Количество антитела против ANGPTL3, содержащееся в отдельных дозах, может быть выражено в миллиграммах антитела на килограмм массы тела пациента (т.е. мг/кг). Например, антитело против ANGPTL3 может быть введено пациенту в дозе от приблизительно 0,0001 до приблизительно 10 мг/кг массы тела пациента.

Комбинированные терапии.

Как описано в другом месте настоящей заявки, способы настоящего изобретения могут включать введение ингибитора ANGPTL8 в комбинации с ингибитором ANGPTL3 пациенту, который не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную гиполипидемическую терапию. В некоторых вариантах осуществления необходимость дальнейшего применения гиполипидемической терапии можно полностью исключить. В некоторых вариантах осуществления комбинированное применение ингибитора ANGPTL8 с ингибитором ANGPTL3 может применяться в комбинации с ("в дополнение к") ранее назначенной гиполипидемической терапии у пациента. Например, в контексте снижения по меньшей мере одного показателя липида/липопротеина у пациента, страдающего гиперлипидемией (например, гиперхолестеринемией или гипертриглицеридемией), где пациент не отвечает на, не поддается контролю или не переносит стандартную гиполипидемическую терапию, комбинация ингибитора ANGPTL8 с ингибитором ANGPTL3 может быть введена пациенту в комбинации со стабильной терапевтической схемой с ежедневным применением статина. Примерные терапевтические схемы с ежедневным применением статина, в комбинации с которыми могут вводить ингибитор ANGPTL8 плюс ингибитор ANGPTL3, в рамках настоящего изобретения включают, например, аторвастатин (10, 20, 40 или 80 мг ежедневно), (аторвастатин/эзетимиб 10/10 или 40/10 мг ежедневно), розувастатин (5, 10 или 20 мг ежедневно), церивастатин (0,4 или 0,8 мг ежедневно), питевастатин (1, 2 или 4 мг ежедневно), флувастатин (20, 40 или 80 мг ежедневно), симвастатин (5, 10, 20, 40 или 80 мг ежедневно), симвастатин/эзетимиб (10/10, 20/10, 40/10 или 80/10 мг ежедневно), ловастатин (10, 20, 40 или 80 мг ежедневно), правастатин (10, 20, 40 или 80 мг ежедневно) и их комбинации. Другие липид-модифицирующие терапии, с которыми ингибитор ANGPTL8 плюс ингибитор ANGPTL3 могут вводить в комбинации, в рамках настоящего изобретения включают, например, (1) средство, которое ингибирует поглощение холестерина и/или реабсорбцию желчных кислот (например, эзетимиб); (2) средство, которое усиливает катаболизм липопротеинов (такое как ниацин); и/или (3) активаторы фактора транскрипции LXR, который играет роль в выведении холестерина, такие как 22-гидроксихолестерин.

Неограничивающий пример антитела против ANGPTL8, которое может применяться в рамках настоящего изобретения, включает антитело, включающее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 1/5, или его антигенсвязывающую часть.

Неограничивающий пример антитела ANGPTL3, применяемого в рамках настоящего изобретения, включает эвинакумаб, включающий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 10/14, или его антигенсвязывающую часть.

Схемы применения.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения многократные дозы ингибитора ANGPTL8 (т.е. фармацевтической композиции, включающей ингибитор ANGPTL8) и ингибитора ANGPTL3 (т.е. фармацевтической композиции, включающей ингибитор ANGPTL3) могут вводить субъекту в течение определенного периода (например, в дополнение к терапевтической схеме с ежедневным введением статина или другой базовой липид-модифицирующей терапии). Способы согласно данному аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту многократных доз ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3. При использовании в настоящей заявке "последовательное введение"

означает, что каждую дозу ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3 вводят субъекту в разное время, например в разные дни, разделенные установленным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3 с последующим введением одной или более вторичных доз ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3 и, необязательно, с последующим введением одной или более третичных доз ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3.

Термины "начальная доза" "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения отдельных доз фармацевтической композиции, включающей ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале курса 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 ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3, однако обычно они могут отличаться друг от друга частотой введения. Впрочем, в некоторых вариантах осуществления количества ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3, содержащиеся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, отличается (например, скорректировано в сторону повышения или понижения, в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале курса лечения в качестве "нагрузочных доз", после которых следуют дозы, вводимые менее часто (например, "поддерживающие дозы").

Согласно примерам 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. Фраза "непосредственно предшествующая доза" при использовании в настоящем описании означает, в последовательности из нескольких введений, дозу антигенсвязывающей молекулы, которую вводят пациенту перед введением следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно данному аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз ингибитора ANGPTL8 и ингибитора ANGPTL3. Например, в определенных 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 больше) вторичных доз. Аналогичным образом, в некоторых 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 больше) третичных доз.

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу могут вводить с такой же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу могут вводить пациенту через 1-2, 4, 6, 8 или больше недель после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах осуществления, включающих множество третичных доз, каждую третичную дозу могут вводить с такой же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу могут вводить пациенту через 1-2, 4, 6, 8 или больше недель после непосредственно предшествующей дозы. В альтернативе частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводят пациенту, может изменяться в течение периода лечения. Частоту введения в течение периода лечения также может корректировать врач в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Примеры

Следующие примеры предложены, чтобы предоставить средним специалистам в данной области полное раскрытие и описание вариантов создания и применения способов и композиций изобретения, и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия по обеспечению точности в отношении используемых числовых значений (например, количеств, температуры и т.д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по весу, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура указана в градусах Цельсия, а давление находится на уровне или вблизи атмосферного.

Пример 1. Получение человеческих антител к человеческому ANGPTL8.

Антитела против ANGPTL8 получали при иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. генномодифицированной мыши, включающей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и легкой цепи человеческого иммуноглобулина) иммуногеном, включающим рекомбинантный человеческий ANGPTL8, экспрессированный с С-концевой меткой, мышинным IgG2a Fc (см. SEQ ID NO: 9). Продукцию антител контролировали с помощью ANGPTL8-специфичного иммуноанализа. Когда требуемый иммунный ответ был достигнут, несколько полностью человеческих против ANGPTL8 антител были получены из антигенположительных В-клеток, как описано в заявке US 2007/0280945A1, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки.

Примерный ингибитор ANGPTL8, используемый в следующем примере, представляет собой человеческое антитело против ANGPTL8, обозначенное "H4H15341P". Варибельная область тяжелой цепи (HCVR) включает SEQ ID NO: 1, и варибельный домен легкой цепи (LCVR) включает SEQ ID NO: 5; определяющая комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1) включает SEQ ID NO: 2, HCDR2 включает SEQ ID NO: 3, HCDR3 включает SEQ ID NO: 4, определяющая комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1) включает SEQ ID NO: 6, LCDR2 включает SEQ ID NO: 7, и LCDR3 включает SEQ ID NO: 8.

Пример 2. Получение человеческих антител к человеческому ANGPTL3.

Человеческие антитела против ANGPTL3 получали, как описано в патенте США 9,018,356. Примерный ингибитор ANGPTL3, применяемый в следующем Примере, является человеческим антителом против ANGPTL3, обозначенным "H4H1276S", также известным как "эвинакумаб". H4H1276S имеет следующие особенности аминокислотной последовательности: варибельную область тяжелой цепи (HCVR), включающую SEQ ID NO: 10, и варибельный домен легкой цепи (LCVR), включающий SEQ ID NO: 14; определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), включающую SEQ ID NO: 11, HCDR2, включающую SEQ ID NO: 12, HCDR3, включающую SEQ ID NO: 13, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), включающую SEQ ID NO: 15, LCDR2, включающую SEQ ID NO: 16, и LCDR3, включающую SEQ ID NO: 17.

Пример 3. *In vivo* действие антитела против ANGPTL3 на уровни циркулирующих триглицеридов и холестерина в ANGPTL8 нокаутных (KO) мышах и мышах дикого типа (WT).

Действие антитела ANGPTL3 H4H1276S на сывороточные триглицериды (ТГ) и общий холестерин оценивали на Angptl8 нокаутных мышах и мышах дикого типа. У мышей предварительно забирали кровь натощак с возобновлением кормления (кормление возобновляли в течение 6 ч после ночного голодания) за 5 дней до эксперимента. Мышей сортировали в группы (по 5 мышей на антитело на генотип) на основе их исходных уровней ТГ и общего холестерина. Антитела, изотипически однородный (hIgG4) контроль нерелевантной специфичности и H4H1276S (против ANGPTL3), вводили в однократной дозе путем подкожной инъекции в День 0 исследования в количестве 10 мг/кг. У мышей забирали кровь в дни 2 и 8 натощак с возобновлением кормления и определены уровни ТГ и общего холестерина в сыворотке с помощью ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Средние значения вычисляли для каждого момента времени. Результаты, выраженные как (среднее±SEM), показаны на фиг. 1 и 2. На фиг. 1 показаны результаты уровней триглицеридов у ANGPTL8 KO мышей и у мышей WT. На фиг. 2 показаны результаты уровней общего холестерина у ANGPTL8 KO мышей и у мышей WT.

Результаты.

Действие антитела к ANGPTL3 H4H1276S на уровни циркулирующих ТГ и общего холестерина оценивали на Angptl8 нокаутных мышах и мышах дикого типа. Применение H4H1276S вызывало значимое снижение уровня циркулирующих ТГ и общего холестерина у мышей дикого типа, что согласуется с представленными ранее данными (Gusarova et al, 2015, J. Lipid Res. (2015), Jul; 56(7):1308-17). H4H1276S также вызывало значимое снижение уровней ТГ у мышей с нокаутом Angptl8, у которых уже был пониженный исходный уровень ТГ в результате делеции Angptl8. Общий холестерин также значимо снижался при введении H4H1276S мышам с нокаутом Angptl8. Эти данные указывают, что ингибирование ANGPTL3 и ANGPTL8 может оказывать аддитивное действие на уровни циркулирующих ТГ.

Пример 4. *In vivo* действие антител против ANGPTL8 и против ANGPTL3 и их комбинации на циркулирующие триглицериды (ТГ) и общий холестерин (ОХ) у гуманизированных ANGPTL8 мышей

Влияние комбинированного лечения антителами против ANGPTL8 и против ANGPTL3 на сывороточные уровни триглицеридов (ТГ) и общего холестерина оценивали у ANGPTL8 гуманизированных мышей. У мышей предварительно забирали кровь за 6 дней до эксперимента не натощак. Мышей сортировали в группы (по пять мышей на каждое тестируемое антитело или комбинацию антител) в зависимости от их исходных значений ТГ и массы тела. Антитела вводили в однократной дозе путем подкожной инъекции в День 0 исследования: изотипически однородный (hIgG4) контроль нерелевантной специфичности, H4H15341P и H4H1276S вводили в дозе 3 мг/кг и комбинации H4H15341P и H4H1276S вводили в 2-х дозах, по 1,5 мг/кг или 3 мг/кг каждого. У мышей забирали кровь (не натощак) в дни 1, 4, 8 и 14 после инъекции антител, уровни ТГ и общего холестерина определяли в сыворотке с помощью ADVIA® 1800 Chemistry System (Siemens). Средние значения вычисляли для каждого момента времени. Результаты, выраженные как (среднее±SEM), показаны на фиг. 3 и 4. На фиг. 3 показано действие на триглицериды, когда антитела к ANGPTL3 или ANGPTL8 применяли по отдельности или когда их применяли в комбинации. Измерения выполняли в дни 1, 4, 7 и 14 после введения. На фиг. 4 показано действие на уровень общего холестерина, когда антитела к ANGPTL3 или ANGPTL8 применяли по отдельности или когда их применяли в комбинации. Измерения выполняли в дни 1, 4, 7 и 14 после введения.

Результаты.

Влияние комбинированного лечения H4H15341P (против hANGPTL8) и H4H1276S (против ANGPTL3) на уровни циркулирующих ТГ исследовали у ANGPTL8 гуманизированных мышей. Введение одного мАт или комбинации вызывало значимое снижение уровня циркулирующих ТГ, при этом

комбинированное лечение показало аддитивное действие в отношении уровней ТГ в сыворотке по сравнению с действием одного мАт.

Пример 5. Исследования взаимодействия AngPТL3 и AngPТL8.

Ангиопоэтин-подобный белок 3 (ANGPТL3) и ANGPТL8 представляют собой секретируемые белки и являются ингибиторами опосредованного липопротеинлипазой (ЛПЛ) клиренса триглицеридов из плазмы. Исследовали то, как эти белки ANGPТL взаимодействуют, осуществляя регуляцию активности ЛПЛ при доставке требуемых количеств жирных кислот в ткани для хранения или окисления. ANGPТL3 ингибирует активность ЛПЛ и повышает триглицериды (ТГ) в сыворотке у мышей независимо от ANGPТL8. Действие на активность ЛПЛ и ТГ сыворотки можно инвертировать с помощью блокирующего антитела к ANGPТL3. Было обнаружено, что ANGPТL8 имеет функциональный ЛПЛ-ингибирующий мотив, но требует, чтобы ANGPТL3 ингибировал ЛПЛ и повышал ТГ сыворотки у мышей. Сайт-направленный мутагенез показал, что способность ANGPТL8 блокировать активность ЛПЛ и повышать ТГ в сыворотке не требовала ANGPТL3 с функциональным ЛПЛ-ингибирующим мотивом. Антитело к С-концу ANGPТL8 (см. пример 6) устраняло ингибирование ЛПЛ, вызванное ANGPТL8 в присутствии ANGPТL3. Антитело не разрушает комплекс ANGPТL8:АНGPТL3, но приходит в непосредственную близость от ЛПЛ-ингибирующего мотива на N-конце ANGPТL8. В совокупности эти данные указывают, что ANGPТL8 имеет функциональный ЛПЛ-ингибирующий мотив, но может ингибировать ЛПЛ только в присутствии ANGPТL3 (Haller, J. et al. Nature Scientific Reports, принято к публикации в 2017 году).

Пример 6. Блокирующее антитело против ANGPТL8 устраняет ANGPТL8-индуцированное ингибирование ЛПЛ, не нарушая взаимодействие ANGPТL3.

Библиотеку пептидов длиной 15 аминокислот и со смещением на один остаток использовали для идентификации эпитопов 8 моноклональных антител, связывающих человеческий ANGPТL8 с высокой аффинностью ($K_d=2,4 \times 10^{-10}$ М; 8×10^{-9} М; фиг. 5). Эпитопы показаны на фиг. 6а. Антитела не демонстрировали перекрестного реагирования с мышинным ANGPТL8 и были исследованы на эффективность *in vivo* у ANGPТL8 гуманизированных мышей (Gusarova et al., принято к публикации в 2017 году). Неожиданно только одно антитело (mAb 7 или H4H15341P) вызывало значимое снижение ТГ в сыворотке (фиг. 6б). Это антитело связывается с эпитопом (аминокислоты 171-180) в С-концевой области ANGPТL8 (фиг. 6а). Недавно сообщали, что это антитело также снижает циркулирующий ТГ на 65% у яванских макаков (Gusarova et al., принято к публикации в 2017 году). На фиг. 6с показано, что антитело дозозависимо ($EC_{50}=0,47$ нМ) устраняет ингибирующее воздействие ANGPТL8 на ЛПЛ. Это исследование выполняли на клетках HEK293, коэкспрессирующих ANGPТL3.

Поскольку блокирующее антитело против ANGPТL8 связывается с С-концевой частью и ЛПЛ-ингибирующим мотивом, расположенным в N-концевой области, хотели исследовать, опосредует ли оно свое действие, нарушая взаимодействие ANGPТL3 и ANGPТL8. С этой целью использовали анализ сближения AlphaLISA, где сигнал детектируют при совместной экспрессии ANGPТL3 и ANGPТL8 (фиг. 6д, слева). Сигнал AlphaLISA оставался сильным, даже когда тестировали высокие концентрации антитела. Эти данные указывают, что блокирующее антитело против ANGPТL8 не восстанавливает активность ЛПЛ, нарушая взаимодействие ANGPТL8:АНGPТL3.

Структурное моделирование недавно предсказало, что ANGPТL8 сворачивается таким образом, чтобы N- и С-концевые домены находились в непосредственной близости (Siddiqua et al. (2016) Comput Biol Chem, 61, 210-220). Таким образом, выдвинули гипотезу, что блокирующее антитело к ANGPТL8 может стерически перекрывать ингибирующий мотив в ANGPТL8, препятствуя ингибированию ЛПЛ. Для проверки этой гипотезы блокирующее антитело к ANGPТL8 и неблокирующее антитело к ANGPТL8 (mAb4 (H4H15347P)), которое связывается с центральной областью белковой последовательности ANGPТL8, метили FRET акцепторным красителем. Кроме того, ANGPТL8 на его N-концевом сайте метили донорным красителем, как показано на фиг. 6е. При коэкспрессии меченого ANGPТL8 с ANGPТL3 в клетках HEK293 и анализе с использованием меченых антител обнаружили намного более сильный TR-FRET сигнал с блокирующим антителом ANGPТL8, направленным на С-концевой фрагмент, по сравнению с сигналом неблокирующего антитела (фиг. 6ф). Эти результаты указывают, что N- и С-концы ANGPТL8 расположены в непосредственной близости, и что блокирующее антитело к ANGPТL8 может стерически препятствовать связыванию ингибирующего мотива ANGPТL8 с ЛПЛ.

Материалы и методы.

Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов выполняли с помощью PEPSKAN PESTO BE. Коротко, стандартный Fmoc-пептидный синтез использовали для синтеза пептидов длиной 15 аминокислот с перекрывающимся участком длиной 14 аминокислот. Антитело, связывающееся с каждым пептидом, тестировали в ИФА на основе PEPSKAN: первичное антитело инкубировали в концентрации 1 мкг/мл (в течение ночи при 4°C) с последующим инкубированием с HRP-конъюгатом антитела козы против IgG человека (1 ч при 25°C). После промывки добавляли субстрат пероксидазы, 2,2'-азино-ди-3-этилбензотиазолинсульфонат (ABTS) и 10 мкл/мл 3% H₂O₂, и измеряли цветное окрашивание при использовании камеры на приборах с зарядовой связью.

Анализ AlphaLISA.

Анализ проводили в формате 384-луночного планшета при комнатной температуре. Среду культивирования клеток CHO-K1 (2,5 мкл), трансфицированных вектором, содержащим ANGPTL3-мус и ANGPTL8-V5, или пустым вектором, инкубировали с указанными количествами антител в течение 1 ч в конечном объеме 20 мкл. Затем добавляли анти-V5 Alpha акцепторные гранулы (PerkinElmer) и инкубировали в течение еще 30 мин, с последующим инкубированием в течение 1 ч с биотинилированным антителом против мус (собственного производства) и стрептавидин Alpha донорными гранулами (PerkinElmer). Все разведения подготавливали в буфере Hi-Block (PerkinElmer), конечная концентрация составляла 10 нг/мл для гранул и 10 нМ для биотинилированного антитела в общем объеме 50 мкл. Сигнал AlphaLISA измеряли на спектрофотометре Envision® Multilabel Reader (PerkinElmer) согласно инструкциям производителя.

Эксперимент TR-FRET с антителами.

Клетки HEK293T котрансфицировали плазмидой, кодирующей ANGPTL3, и плазмидой, кодирующей N-концевой Avi-меченный ANGPTL8, при использовании реактива для трансфекции TransIT-LT1. Клеточные среды собирали через 72 ч, концентрировали 20× при использовании концентраторов Centriprep (Millipore) с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа и подвергали сайт-направленному биотинилированию с использованием биотин-протеинлигазы BigA (Avidity) (Fairhead & Howarth, 2015) согласно инструкциям поставщика, затем проводили диализ против PBS. Биотинилирование Avi-ANGPTL8 подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга при использовании стрептавидина-HRP для обнаружения. Антитела метили при использовании набора Alexa Fluor™ 647 Antibody Labeling Kit (Invitrogen). Концентрации антител и красителя определяли спектрофотометрически, и отношение лекарственного средства к антителу 5:2 использовали во всех экспериментах. TR-FRET проводили в формате 384-луночного планшета. Конечная концентрация составляла 31,3 нМ Европий-стрептавидина, 25 нМ меченого антитела, 50% биотин-Avi-ANGPTL8 в буфере для разведения TR-FRET (PerkinElmer). TR-FRET измеряли при использовании спектрофотометра Envision® Multilabel Reader (PerkinElmer), фильтра возбуждения 340/30 нм, фильтра эмиссии 1-615/8,5 нм, фильтра эмиссии 2-665/7,5 нм, дихроичного зеркала D400/D630, измерения проводили с задержкой 100 мс и временным окном 2 мс.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента, страдающего гиперлипидемией, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества комбинации ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) и ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3),

где ингибитор ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и

где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и

где введение осуществляется посредством подкожной инъекции.

2. Способ по п.1, где гиперлипидемия является семейной гиперлипидемией или приобретенной гиперлипидемией.

3. Способ по п.1, где гиперлипидемия выбрана из группы, состоящей из гиперлипопротеинемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии и гиперхиломикронемии.

4. Способ по п.2, где семейная гиперлипидемия является гиперхолестеринемией, выбранной из группы, состоящей из гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HeFH) и гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (HoFH).

5. Способ по п.2, где приобретенная гиперлипидемия является следствием чрезмерного употребления алкоголя, ожирения, побочного действия лекарственных средств (например, гормонов или стероидов), диабета, болезни почек, гипофункции щитовидной железы или беременности.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL8, содержит HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

7. Способ по любому из пп.1-5, где анти-ANGPTL3 антителом является эвинакумаб.

8. Способ по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, содержит HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14.

9. Способ снижения уровня по меньшей мере одного липидного показателя у пациента, страдающего нарушением или состоянием, характеризуемым частично повышенными уровнями липидов или липопротеинов, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективного количества комбинации ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) и ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3),

где ингибитор ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и

где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и

где введение осуществляется посредством подкожной инъекции.

10. Способ по п.9, где нарушением или состоянием является гиперлипидемия, выбранная из группы, состоящей из семейной гиперлипидемии и приобретенной гиперлипидемии.

11. Способ по п.9, где нарушением или состоянием является гиперлипидемия, выбранная из группы, состоящей из гиперлипидопроteinемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии и гиперхиломикронемии.

12. Способ по п.10, где семейная гиперлипидемия является гиперхолестеринемией, выбранной из группы, состоящей из гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (HoFH) и гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (HoFH).

13. Способ по п.10, где приобретенная гиперлипидемия является следствием чрезмерного употребления алкоголя, ожирения, побочного действия лекарственного средства (например, гормонов или стероидов), диабета, болезни почек, гипофункции щитовидной железы или беременности.

14. Способ по любому из пп.9-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфично связывается с ANGPTL8, содержит HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

15. Способ по любому из пп.9-13, где анти-ANGPTL3 антителом является эвинакумаб.

16. Способ по любому из пп.9-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, содержит HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14.

17. Способ по любому из пп.1-16, где ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 вводят одновременно или последовательно.

18. Способ по любому из пп.1-16, где ингибитор ANGPTL8 и ингибитор ANGPTL3 вводят в терапевтически эффективных концентрациях в отдельных фармацевтических композициях или включают в состав одной фармацевтической композиции.

19. Применение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) в комбинации с ингибитором ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) для лечения пациента, страдающего гиперлипидемией,

где ингибитор ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и

где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17.

20. Применение ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) в комбинации с ингибитором ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) для получения лекарственного средства для лечения пациента, страдающего гиперлипидемией,

где ингибитор ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и

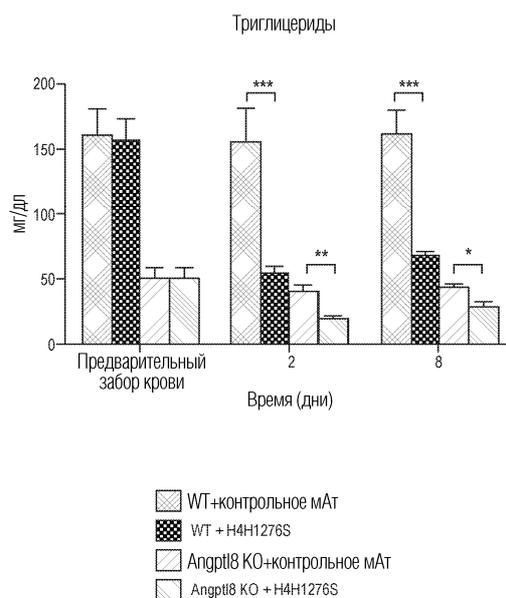
где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17.

21. Фармацевтическая композиция для лечения пациента, страдающего гиперлипидемией, где композиция включает терапевтически эффективное количество комбинации ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 8 (ANGPTL8) и ингибитора ангиопоэтин-подобного белка 3 (ANGPTL3),

где ингибитор ANGPTL8 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR1 легкой цепи (LCDR1) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, и

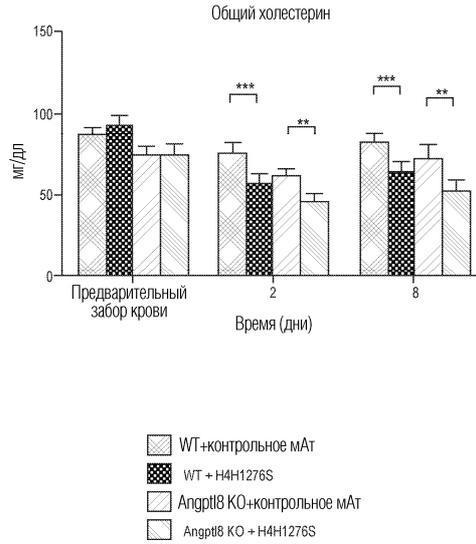
где ингибитор ANGPTL3 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с ANGPTL3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и

приемлемый носитель или вспомогательный агент.

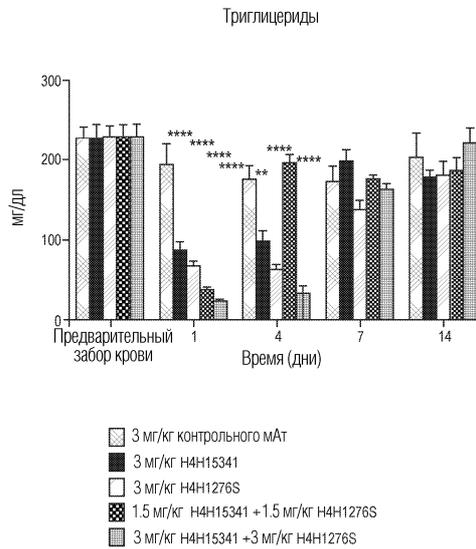


Фиг. 1

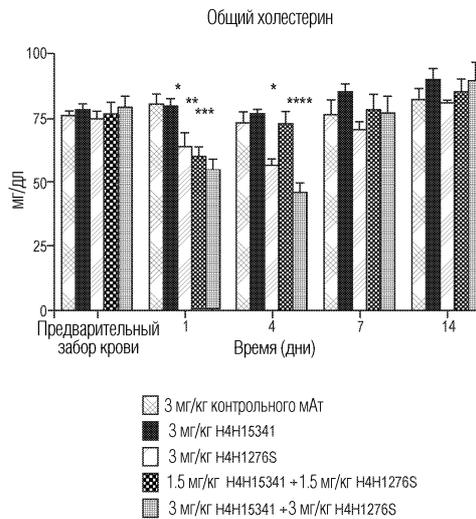
040479



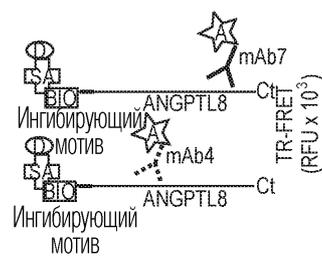
Фиг. 2



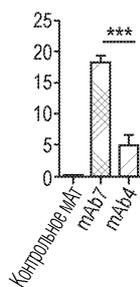
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 6e



Фиг. 6f



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2