Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi 2016; 7 (3): 19-31

AGGIORNAMENTO

LE "ANGIOPOIETIN-LIKE PROTEINS" -3 E -4 (ANGPTL3, ANGPTL4): POSSIBILI BERSAGLI TERAPEUTICI NEL TRATTAMENTO DELLE DISLIPIDEMIE

Angiopoietin-like proteins -3 and -4 (ANGPTL3, ANGPTL4): possible targets for the treatment of dyslipidemias

SEBASTIANO CALANDRA[1], STEFANO BERTOLINI[2]

[1]Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze, Università di Modena e Reggio Emilia;
[2]Dipartimento di Medicina Interna, Università di Genova

SUMMARY

Over the last few years we have witnessed the emerging metabolic role of some molecules belonging to the family of the Angiopoietin-Like Proteins (ANGPTLs). More specifically Angiopoietin-Like Protein 3 (ANGPTL3) and Angiopoietin-Like Protein 4 (ANGPTL4) were found to play a key role in the metabolism of plasma lipoproteins. ANGPTL3 is a physiological inhibitor of Lipoprotein Lipase (LPL) and Endothelial Lipase (EL), facilitates the assembly and secretion of VLDL-Triglyceride and controls the receptor independent removal of LDL from the circulation. The defect of ANGPTL3 due to genomic variants with loss of function in humans or the gene inactivation in mice are associated with a marked reduction of the plasma levels of VLDL, LDL and HDL (combined hypolipidemia). On the other hand genomic variants with loss of function of ANGPTL4 in humans and gene inactivation in mice, are associated with a reduction of the plasma level of triglyceride-rich lipoproteins and a modest but significant increase of that of HDL. These observations have generated the hypothesis that the inhibition of ANGPTL3 or ANGPTL4 with a monoclonal antibody might be a novel strategy for the treatment of hypertriglyceridemia and mixed hyperlipidemia. Recent studies conducted in animal models, including non- human primates, have demonstrated that the short term treatment with monoclonal antibodies against ANGPTL3 and ANGPTL4, induces an activation of LPL and a marked reduction of plasma triglyceride rich lipoproteins, without major side effects. In addition a pilot study in 4 patients with homozygous Familial Hypercholesterolemia has shown that a short-term treatment with anti-ANGPTL3 monoclonal antibody induces as dramatic reduction of plasma LDL, suggesting that this treatment might be a new tool in the therapy of severe hypercholesterolemias. Overall these observations can be viewed as "proofs of concept" that ANGPTL3 and ANGPTL4 can be regarded as new targets in the treatment of atherogenic dyslipidemias.

Key words: *Angiopoietin-like protein 3; Angiopoietin-like protein 4; Familial Combined Hypolipidemia; Lipoprotein Lipase; Endothelial Lipase; Hypertriglyceridemias; Mixed Hyperlipidemias.*

Introduzione

Le Angiopoietin-like proteins (ANGPTLs) costituiscono una famiglia di proteine che comprende 8 membri, sette dei quali presentano analogie strutturali con le angiopoietine, le proteine regolatrici dell'angiogenesi (*Figura 1*).
Tuttavia le ANGPTLs non si legano con alta affinità ai recettori delle angiopoietine (TIE1 e TIE2) espressi sulla membrana delle cellule endoteliali e hanno scarsa o nessuna capacità di indurre l'angiogenesi. Le ANGPTLs (con l'eccezione della ANGPTL8, denominata anche lipasina o betatrofina) possiedono domini molecolari comuni alle angiopoietine, quali un dominio "coiled-coil" (costituito da sequenze di aminoacidi super-avvolte a matassa) nella regione N-terminale e un dominio "fibrinogen-like" nella regione C-terminale; questi due domini sono uniti da una sequenza di aminoacidi ("linker region") in cui risiede la regione di clivaggio proteolitico della molecola nativa (*Figura 1* e *2*).
La ANGPTL8 possiede solo il dominio N-terminale presente nelle altre ANGPTLs (*Figura 3*).
Tre membri della famiglia delle ANGPTLs (ANGPTL3, ANGPTL4 e ANGPTL8) rivestono un ruolo importante nel metabolismo delle lipoproteine plasmatiche e dei lipidi tessutali come dimostrato da studi sperimentali in modelli animali e da osservazioni cliniche nell'uomo (1-3). Questa breve rassegna si concentra su ANGPTL3 e ANGPTL4 che sono considerate nuovi potenziali bersagli terapeutici per il trattamento delle dislipidemie.

Indirizzo per la corrispondenza
Sebastiano Calandra
Dipartimento di Scienze Biomediche,
Metaboliche e Neuroscienze,
Università di Modena e Reggio Emilia
Via Campi, 287 - 41125 Modena
E-mail: sebcal@unimore.it

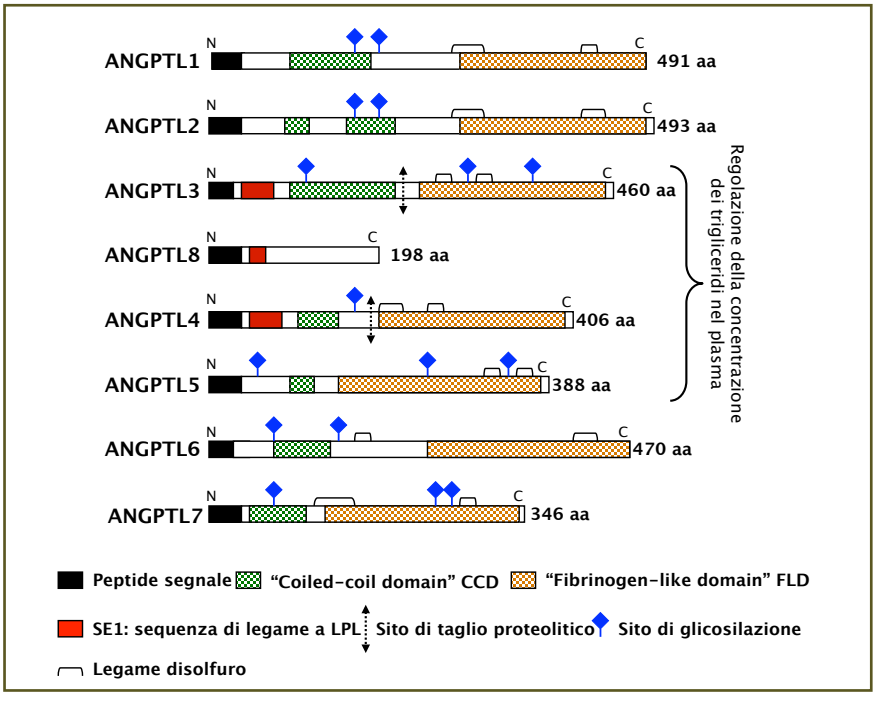

Figura 1 - Famiglia delle Angiopoietin-Like Proteins (ANGPTLs). La figura mostra i domini molecolari delle varie molecole, i siti di taglio proteolitico ed i siti di glicosilazione. ANGPTL3, ANGPTL8 e ANGPTL4, presentano nella regione N-terminale una sequenza di legame per l'enzima Lipasi Lipoproteica attraverso la quale si esercita l'effetto inibitorio sull'enzima. Queste 3 molecole partecipano alla regolazione dei i livelli di trigliceridi nel sangue.

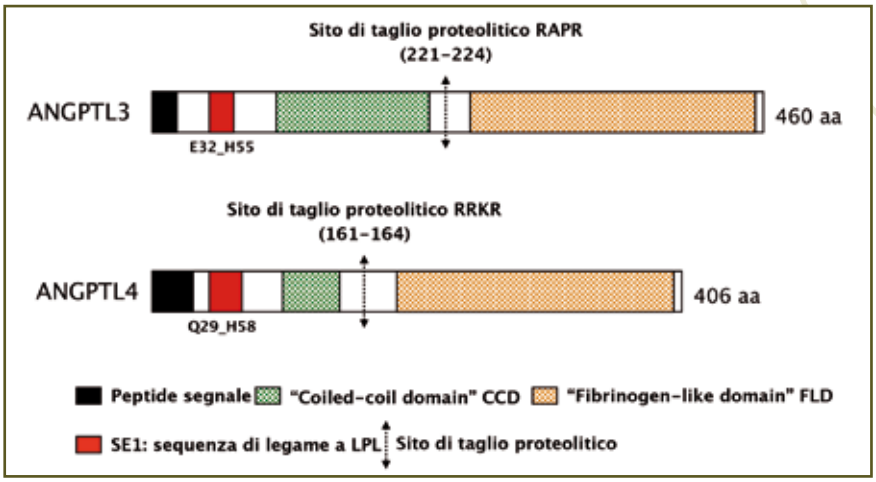

Figura 2 - Struttura dell'ANGPTL3 e dell'ANGPTL4. La ANGPTL3 ha un effetto inibitorio sia sulla Lipasi Lipoproteica che sulla Lipasi Endoteliale. La ANGPTL4 ha un effetto solo sulla Lipasi Lipoproteica.

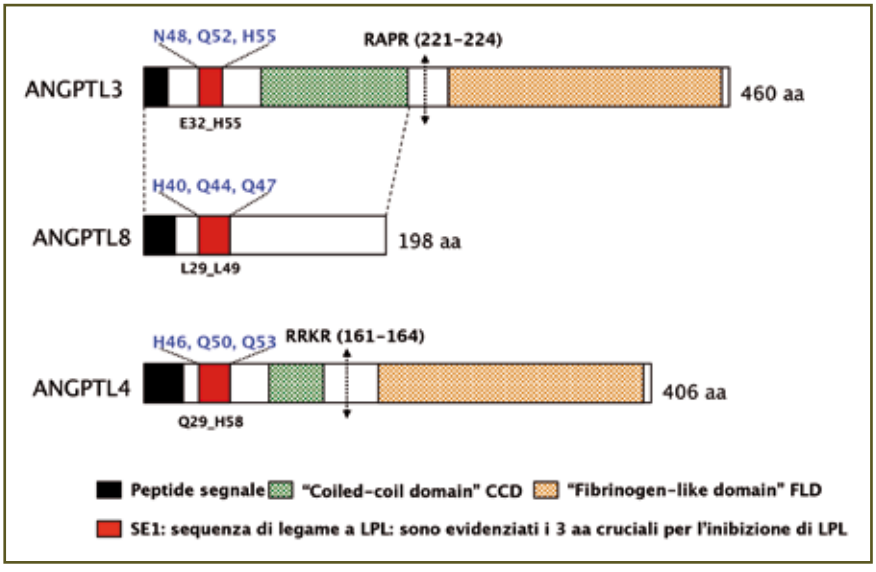

Figura 3 - Confronto fra la struttura delle tre Angiopoietin-Like Proteins (ANGPTL3, ANGPTL8 e ANGPTL4) che regolano il metabolismo lipoproteico. La regione N-terminale di ANGPTL3 e di ANGPTL4 (che lega la Lipasi Lipoproteica, LPL) è simile alla intera molecola di ANGPTL8. Per ogni molecola è indicata la regione di legame con la LPL e gli aminoacidi importanti per la inibizione della LPL.

ANGPTL3 e la ipolipidemia combinata

La prima dimostrazione del ruolo dell'ANGPTL3 nel metabolismo lipoproteico è emersa dallo studio di un ceppo di topi (KK/San mice) che, pur presentando diabete ed obesità, avevano livelli plasmatici di trigliceridi estremamente ridotti (>90%) (dovuti a ridotti livelli di VLDL) rispetto agli animali di controllo (obesi, diabetici ed ipertrigliceridemici). Di fatto i topi KK/San avevano anche ridotti i livelli di LDL e HDL, sia pure in misura più contenuta, presentando quindi una condizione di ipolipidemia combinata. Tale condizione aveva una trasmissione autosomica recessiva. Studi genetici successivi hanno dimostrato che i topi KK/San erano portatori omozigoti di una mutazione nel gene *Angptl3* che codifica la angiopoietin-like 3 (Angptl3), una proteina plasmatica prodotta dal fegato di cui non si conosceva la funzione. La mutazione del gene *Angptl3* allo stato omozigote produceva una proteina Angptl3 anomala priva di funzione. Ulteriori ricerche hanno confermato la

presenza di ipolipidemia combinata in topi normali in cui era stato inattivato il gene *Angptl3* (topi *Angptl3-/-*) (3).
Il ruolo della ANGPTL3 nell'uomo è emerso da due serie di osservazioni:

1) da studi "genome wide" (GWAS) che hanno dimostrato un'associazione tra alcuni polimorfismi genomici localizzati vicino o all'interno del gene *ANGPTL3* ed i livelli di trigliceridi e di HDL;
2) dalla dimostrazione che alcuni individui con ipolipidemia familiare combinata (ridotti livelli di tutte le classi di lipoproteine) risultavano essere portatori omozigoti (o eterozigoti composti) di mutazioni del gene *ANGPTL3,* che si traducevano in una completa perdita di funzione della proteina ANGPTL3 e nella sua assenza nel plasma (3-7).

Anche individui portatori eterozigoti di mutazioni del gene *ANGPTL3* con perdita di funzione, presentavano più bassi livelli di lipoproteine plasmatiche rispetto ai soggetti di controllo (7).

ANGPTL3: inibitore della lipasi lipoproteinca e della lipasi endoteliale

I meccanismi attraverso i quali il deficit genetico di ANGPTL3 induce una riduzione dei livelli plasmatici di VLDL e di HDL sono stati studiati in modo approfondito. In condizioni fisiologiche la ANGPTL3 inibisce due lipasi intra-vascolari: la Lipasi Lipoproteica (LPL) e la Lipasi Endoteliale (EL). La LPL è responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi contenuti nei chilomicroni e nelle VLDL; la EL, che funziona prevalentemente come fosfolipasi, idrolizza i fosfolipidi delle HDL. La mancata inibizione di questi due enzimi, che si verifica nel difetto genetico di ANGPTL3, si traduce in un'aumenta attività dei due enzimi lipolitici. Studi condotti sui topi *Angptl3-/-* (con deficit completo di Angptl3) hanno dimostrato un'aumentata attività della LPL e della EL. Anche nei soggetti con ipolipidemia familiare combinata è stata dimostrata attivazione di LPL e EL (8-14).
La ANGPTL3, legandosi alla LPL, ne determina un cambiamento conformazionale, che si traduce in una aumentata sensibilità dell'enzima alla degradazione da parte di proteasi (pro-protein convertasi), in un'inibizione dell'attività catalitica ed nella dissociazione della LPL dalla superficie endoteliale (*Figura 4*).
Il deficit di ANGPTL3 si traduce anche nell'attivazione della lipasi endoteliale (EL) a cui consegue aumentata idrolisi della frazione fosfolipidica delle HDL. Questo processo porta ad una riduzione delle dimensioni delle HDL ed un loro turn-over accelerato, che si associa ad una parallela riduzione della loro concentrazione plasmatica (*Figura 5*). L'inibizione della EL da parte di ANGPTL3 ha trovato conferma in studi sperimentali nei topi *Angptl3-/-* e nei topi trattati con anticorpi monoclonali contro Angtpl3 murina, nei quali è stata dimostrata un'aumentata attività della lipasi endoteliale. L'inibizione di LPL e EL è prodotta dall'intera molecola di ANGPTL3, così come anche (ed in modo più efficace) dal suo dominio N-terminale che si libera dalla molecola intera dopo clivaggio proteolitico (*Figura 4*) (9-14).

ANGPTL3: possibile bersaglio terapeutico nelle ipetrigliceridemie e nelle dislipidemie miste

La dimostrazione che condizioni di difetto genetico di ANGPTL3 siano associate a ipolipidemia (con riduzione delle lipoproteine aterogene contenenti apoB) ha suggerito che l'inibizione di ANGPTL3 potesse rappresentare una nuova strategia terapeutica nelle dislipidemie (parti-

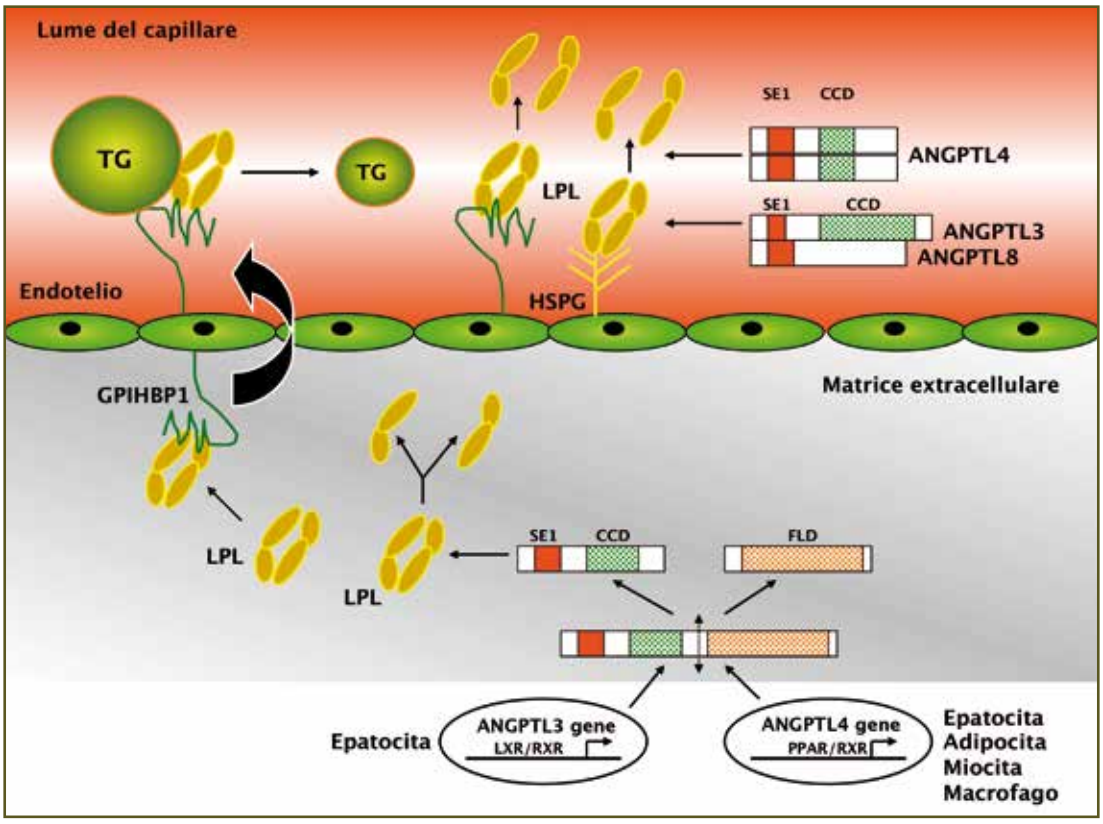

Figura 4 - Inibizione della Lipasi Lipoproteica (LPL) da parte di ANGPTL3 e ANGPTL4. La LPL è presente nello spazio sotto-endoteliale in forma di dimero (biologiamente attivo). Il suo trasferimento a livello della superficie endoluminale dei capillari è mediato dalla proteina GPIHBP1, che sull'endotelio svolge la funzione di piattaforma molecolare per la cascata lipolitica. Il legame della LPL con ANGPTL3 e ANGPTL4 può avvenire già a livello dello spazio sotto-endoteliale, completandosi poi a livello del lume endoteliale ove sono presenti dimeri di ANGPTL4 e ANGPTL4/ANGPTL8 che hanno potente capacità di inattivazione dell'enzima. TG: lipoproteine ricche in trigliceridi; HSPG: eparan-solfato proteoglicani.

colarmente quelle caratterizzate da livelli elevati di trigliceridi o da livelli elevati di trigliceridi e colesterolo) con conseguente riduzione del rischio cardiovascolare. In considerazione dei bassi livelli plasmatici di ANGPTL3, una possibile strategia per inattivare l'ANGPTL3, era quella basata sull'impiego di un anticorpo monoclonale specifico, così come è avvenuto con successo nel caso degli anticorpi anti-PCSK9. Di fatto un anticorpo anti-ANGPTL3 umana (anticorpo REGN1500) è stato generato e testato in una serie di modelli animali ed è in corso di verifica in uno studio di fase I e II nell'uomo (NCT02107872, NCT01749878, NCT02265952, www.clinicaltrials.gov) (15).

Al momento sono disponibili in letteratura solo i risultati degli studi sui modelli animali, che nel complesso hanno fornito la "dimostrazione di principio" (proof of concept) che la ANGPTL3 può essere un nuovo bersaglio terapeutico. L'anticorpo monoclonale REGN1500 è un anticorpo completamente umanizzato anti-ANGPTL3 umana capace di legare con alta affinità anche la Angptl3 di altre specie (topo, ratto e primati non umani), consentendo studi comparativi in

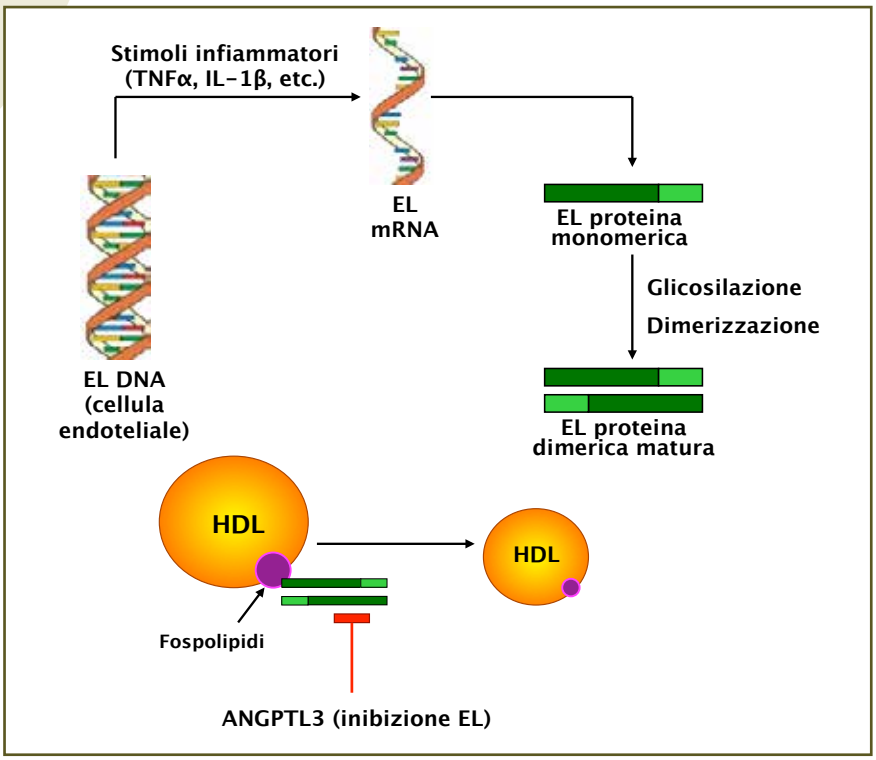

Figura 5 - Inibizione della Lipasi Endoteliale da parte dell'ANGPTL3. La Lipasi Endoteliale (EL) è una lipasi prodotta dall'endotelio sia in condizioni fisiologiche che a seguito di vari tipi di stimoli infiammatori. La EL idrolizza prevalentemente i fosfolipidi contenuti nelle HDL di grandi dimensioni. La idrolisi dei fosfolipidi porta alla formazione di HDL più piccole che sono rimosse dal plasma più rapidamente. Il deficit genetico di ANGPTL3 si associa ad un'aumentata attività della Lipasi Endoteliale che si traduce in una riduzione dei livelli plasmatici di HDL.

diversi modelli animali. Sono qui riassunti i risultati più importanti ottenuti con la somministrazione dell'anticorpo REGN1500 in modelli animali (16, 17).

Studi nei topi

a) Effetti sui livelli plasmatici dei trigliceridi e sulla Lipasi Lipoproteica (LPL).

Nei topi normolipidemici (ceppoC57Bl/6) una singola dose di REGN1500 determina una riduzione del 55% dei livelli di trigliceridi (TG), come risultato di una riduzione dei livelli di VLDL, nel corso di una settimana, con un effetto che si mantiene ancora evidente, sia pure più contenuto, fino a 3 settimane. Questo trattamento riduce anche i livelli di colesterolo totale (CT) del 26%. Gli studi dose risposta (5, 10, 25 mg/kg) dimostrano un riduzione del 66% dei TG nel corso della prima settimana, con la dose di anticorpo più elevata. La somministrazione di REGN1500 determina una riduzione dei livelli di TG e di CT anche nei topi geneticamente obesi-diabetici e dislipidemici (ceppo db/db). La somministrazione dell'anticorpo si associa sia in topi normali sia in topi db/db ad un aumento di circa 2 volte dell'attività della LPL nel plasma post-eparinico (come atteso dopo riduzione dei livelli di Angptl3 indotti dall'anticorpo). Nei topi resi dislipidemici a seguito della somministrazione di una dieta ricca di grassi e di colesterolo (High Fat High Cholesterol Diet) (HFHCD), la somministrazione settimanale di REGN1500 per 8 settimane ha indotto una sostanziale riduzione dei livelli plasmatici di TG del 55%, di TC del 35% e di LDL-C del 45%. Il trattamento con REGN1500 per 8 settimane non ha mostrato effetti collaterali sui parametri generali quali peso corporeo, distribuzione del tessuto adiposo, funzionalità epatica, etc. (16).

b) Effetti sui livelli plasmatici di HDL e sulla Lipasi Endoteliale (EL)
Poiché è noto che ANGPTL3 inibisce l'attività della Lipasi Endoteliale, si è verificato se REGN1500 riducesse i livelli di HDL come osservato nei topi *Angptl3-/-*. Per rispondere a questa domanda l'anticorpo monoclonale è stato somministrato a topi normali e a topi privi di EL (per inattivazione del gene corrispondente, topi *Lipg-/-*). In entrambi i ceppi di topo l'anticorpo REGN1500 ha ridotto i livelli di trigliceridi nella stessa misura, ma la riduzione dei livelli di HDL è stata osservata solo nei topi normali e non nei topi *Lipg-/-* (privi di EL), ad indicare che l'anticorpo blocca l'attività inibitoria di ANGPTL3 nei confronti della lipasi endoteliale [16].

Studi nei primati non umani
L'anticorpo REGN1500 è stato somministrato anche a macachi (macaco cinomolgo) con dislipidemia. Anche in questi animali si è osservata una sostanziale riduzione dei livelli di TG nel corso di qualche giorno dalla somministrazione (48% di riduzione alle dose 3 mg/kg ed 89% alla dose 10 mg/kg). Questa riduzione si è mantenuta per circa 4 settimane dopo la somministrazione di una singola dose di anticorpo. Anche in questo caso si è osservata una riduzione dei livelli di HDL. Quindi nel complesso questi studi mostrano che la somministrazione dell'anticorpo anti-Angptl3 riproduce negli animali un fenotipo biochimico di ipolipidemia combinata simile a quello osservato nel deficit genetico di ANGPTL3 nell'uomo [16].

ANGPTL3: possibile bersaglio terapeutico nelle ipercolesterolemie gravi

È noto che negli individui con deficit genetico completo di ANGPTL3 (in quanto omozigoti/eterozigoti composti per mutazioni del gene *ANGPTL3*), presentano una cospicua riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C simili a quelli riscontrati nella ipobetalipoproteinemia familiare. Il meccanismo di questa riduzione è stato esplorato in topi normali ed in topi con ipercolesterolemia dovuta a difetti genetici della clearance plasmatica delle lipoproteine contenenti apoB [topi con inattivazione del gene apoe (*Apoe-/-*), del gene del recettore LDL (*Ldlr-/-*) o del gene del recettore dei chilomicroni LRP1 (*Lrp1-/-*)] [17].
Questi animali sono stati trattati con l'anticorpo anti-ANGPTL3 REGN1500 per inattivare la Angptl3 endogena. Il trattamento con anticorpo riduceva i livelli plasmatici di trigliceridi e di colesterolo del 40% nelle VLDL e LDL, e parallelamente i livelli plasmatici di apoB-100 sia nei topi normali che in quelli ipercolesterolemici.
Nei topi trattati con REGN1500 è stata osservata una riduzione del 60% della produzione epatica di trigliceridi nelle VLDL (VLDL-TG), suggerendo che una ridotta secrezione epatica di VLDL-TG poteva contribuire alla riduzione dei trigliceridi plasmatici. Tuttavia nei topi trattati con REGN1500 non si è osservata una riduzione della secrezione epatica di ApoB-100 nelle VLDL (VLDL-ApoB100) che rendesse conto dei ridotti livelli plasmatici di apoB100, suggerendo la possibilità che negli animali trattati si verificasse un aumentata rimozione dal circolo di lipoproteine contenti apo B.
Tuttavia nei topi normali trattati con REGN1500 non si osservava alcun aumento della clearance plasmatica recettore-mediata delle lipoproteine contenenti apo E (β-VLDL) o apoB-100 (LDL). Il fatto che la riduzione dei livelli plasmatici di LDL-C ed apoB-100 indotta dal trattamento con REGN1500 avvenisse anche in topi *Apoe-/-*, *Ldlr-/-* o *Lrp1-/-* (con deficit genetico del

sistema di clearance recettore-mediata di lipoproteine contenti apoB), suggeriva la possibilità che l' inattivazione di Angptl3 anticorpo-mediata inducesse una accelerata rimozione dal plasma delle lipoproteine contenenti apoB attraverso una via diversa rispetto a quella recettore-mediata (17).
L'osservazione che nei topi con difetto del recettore LDL (*Ldlr-/-*) l'inibizione di Angptl3 indotta dall'anticorpo monoclonale REGN1500 riduceva i livelli plasmatici di LDL-C e di apoB-100 (17) ha suggerito che tale anticorpo potesse essere efficace nei pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote.
Nel corso del recente congresso della European Atherosclerosis Society (EAS) svoltosi ad Innbruck (Austria) è stato presentato uno studio pilota sull'impiego di REGN1500 (evinacumab) in 4 pazienti con FH omozigote (studio in aperto di Fase II). I pazienti studiati erano in trattamento massimale con statine ed ezetimibe e presentavano livelli di LDL-C basali compresi fra 4.0 e 13 mml/L (media 8,6 mmol/L).
Essi sono stati inizialmente trattati con una dose unica di 250 mg di evinacumab, seguita da una dose endovenosa di 15 mg/Kg alla settimana 2; due pazienti hanno ricevuto una singola dose di 450 mg alle settimane 12, 13, 14 e 15. Il periodo di follow-up è stato di 10 settimane dal termine del trattamento.
Nel complesso il trattamento è stato ben tollerato senza maggiori reazioni avverse. La riduzione dei livelli di LDL-C alla settimana 4 è stata del 54,8% (range 25-90%) rispetto ai livelli basali [18[.
Questo risultato, molto preliminare, suggerisce che un anticorpo anti-ANGPTL3 potrebbe rappresentare un ulteriore strategia terapeutica nei pazienti con FH omozigote non responsivi alle terapie attualmente disponibili.

ANGPTL4: effetti sul profilo lipidico plasmatico

La Angiopoietin -like protein 4 (ANGPTL4) è secreta da diversi tessuti (*Figura 4*) e dopo la sua immissione in circolo, subisce un clivaggio proteolitico che genera un frammento N-terminale ed uno C-terminale. Il frammento N-terminale è presente nel sangue come un oligomero mentre il frammento C-terminale circola come monomero.
Il frammento N-terminale si lega alla LPL e converte l'enzima da attivo ad inattivo trasformandolo da dimero a monomero, incapace di riassumere la conformazione dimerica funzionalmente attiva dell'enzima. Studi in vitro hanno dimostrato che la ANGPTL4 si lega in modo specifico alla LPL ancorata alla proteina GPIHBP1, la piattaforma molecolare che permette l'interazione della LPL con chilomicroni e le VLDL sulla superficie endoluminale delle cellule endoteliali (*Figura 4*). A conferma di queste osservazioni, i topi nei quali è stato inattivato il gene *Angptl4* (*Angptl4-/-*) presentano ridotti livelli di trigliceridi; lo stesso effetto si riscontra in topi nei quali è stato somministrato un anticorpo monoclonale anti-Angptl4. Viceversa, la somministrazione endovenosa ai topi normali di Angptl4 ricombinante determina un aumento dei livelli plasmatici di trigliceridi conseguente ad una marcata inibizione della LPL [1, 2, 13, 19].
Il sequenziamento sistematico del gene *ANGPTL4* in un campione di popolazione multietnica ha rivelato la presenza di varianti genomiche che determinano sostituzioni di singoli aminoacidi nella sequenza proteica, alcune delle quali sono associate a variazioni del profilo lipidico del plasma. In particolare è stata identificata una variante che determina la sostituzione dell'acido glutammico con una lisina alla

posizione 40 nella sequenza aminoacidica della proteina (variante Glu40Lys, anche indicata con la sigla E40K). Tale variante è presente nel ~3% di individui di origine Europea ed è stata trovata associata a più bassi livelli di TG e più elevati livelli di HDL-C ad indicare una ridotta inibizione della LPL e conseguentemente un'aumentata attività della cascata lipolitica (20). Studi in vitro hanno dimostrato che la sostituzione E40K altera la struttura della proteina ANGPTL4 impedendo la formazione degli oligomeri del frammento N-terminale, annullando in tal modo la capacità della proteina mutata di interagire con la LPL ed esercitare il suo effetto inibitorio sull'enzima (*Figura 4*).

Per queste ragioni la variante E40K è considerata una variante con perdita di funzione (loss of function, LOF) (21). L'effetto della variante E40K sui livelli di trigliceridi è stata confermata in una serie di studi recenti [22-26]. Due di questi studi non solo hanno riconfermato l'effetto di questa variante sulla trigliceridemia ma anche indicato un suo effetto protettivo nei confronti del rischio di CHD (25, 26).

Il primo studio (25) ha dimostrato che la variante E40K, così come altre varianti LOF di ANGPTL4 (allo stato eterozigote) sono più frequenti nei soggetti di controllo rispetto a i soggetti con cardiopatia ischemica. Infatti, 19 portatori eterozigoti di queste varianti sono stati trovati nel gruppo dei controlli (6.824 individui, con frequenza della variante pari al 2,7%) rispetto a 9 portatori eterozigoti trovati nei pazienti con CHD (6924 individui, con frequenza della variante pari 1,3%) (P=0,04). Il livello medio dei trigliceridi plasmatici nei soggetti portatori eterozigoti di varianti LOF di ANGPTL4 era inferiore del 35% rispetto a quello riscontrato nei soggetti non portatori (P = 0.003). In questo studio non sono state trovate associazioni fra la presenza di queste varianti ed i livelli di LDL-C o HDL-C. Infine è stato osservato che nel complesso i portatori di varianti LOF avevano un più basso rischio di CHD rispetto ai non portatori (odd ratio 0,47, P=0.04) [25].

Nel secondo studio il gene ANGPTL4 è stato sequenziato in 42,930 individui, prevalentemente Europei, inclusi nello studio DicoverEHR (26).

L'associazione fra le varianti LOF di ANGPTL4 con i lipidi plasmatici è stata analizzata in 10.552 individui con CHD e 29.223 senza CHD. Complessivamente sono stati identificati 1661 eterozigoti e 17 omozigoti per la variante E40K ed altri 75 individui portatori eterozigoti di varianti LOF di vario tipo.

I livelli di TG erano del 13% più bassi e quelli delle HDL-C erano del 7% più elevati nei portatori di E40K rispetto ai non portatori. I portatori della variante E40K avevano minore probabilità di avere CHD rispetto ai non portatori (odd ratio 0,81; intervallo di confidenza 95%: 0,70-0,92; P=0,002). Inoltre i soggetti omozigoti per la variante (individui 40KK) avevano livelli di TG più bassi e livelli di HDL-C più elevati rispetto ai soggetti eterozigoti per questa variante (individui E40K) (effetto di dosaggio genico).

Da questi studi si può concludere che la presenza di varianti genomiche che inattivano la ANGPTL4 (varianti LOF) rappresenta un fattore protettivo nei confronti dello sviluppo di CHD, ascrivibile ad una riduzione dei livelli plasmatici di lipoproteine ricche in trigliceridi, dovuta a sua volta ad un'aumentata attività dell'enzima LPL e la conseguente iper-attivazione della cascata lipolitica.

Su questa base è stato ragionevole ipotizzare che l'inibizione di ANGPTL4 mediata da un anticorpo monoclonale potesse avere un effetto benefico sul profilo lipidico e sul rischio cardio-vascolare.

ANGPTL4: possibile bersaglio terapeutico nelle ipertrigliceridemie

Uno studio esplorativo pilota (finalizzato a esplorate l'inibizione/inattivazione di ANGPTL4 come possibile bersaglio terapeutico) è stato condotto sui modelli animali utilizzando un anticorpo monoclonale umanizzato anti-ANGPTL4 (REGN1001) (26). Questo anticorpo si lega con alta affinità alla ANGPTL4 umana ma non a quella murina.

Pertanto gli studi preliminari sui topi sono stati condotti impiegando topi che esprimevano ANGPTL4 umana e contestualmente erano dislipidemici (topi apoE knock out, *Apoe-/-)*. La somministrazione dell'anticorpo RGN1001 in questi topi determinava una rapida e prolungata (fino a 15 giorni) riduzione dei livelli di TG intorno al 40%. Risultato analogo si è osservato in macachi cinomolgo che presentavano una iperlipidemia indotta da una dieta ad alto contenuto in lipidi (HFHCD) così come in macachi Resus spontaneamente obesi ed iperlipidemici. Questi risultati possono essere intesi come "prova di principio" che l'impiego di un anticorpo anti ANGPTL4 è efficace nel ridurre i livelli plasmatici di alcune classi di lipoproteine aterogene (26).

Tuttavia in alcuni dei topi trattati con una singola dose di REGN1001, è stato osservato un accumulo di lipidi nei macrofagi dei linfonodi mesenterici, con segni di infiammazione cronica e formazione di cellule giganti (cellule di Touton), quando i topi erano stati alimentati con dieta ad alto contenuto lipidico per indurre una dislipidemia.

Questa adenopatia infiammatoria lipogranulomatosa è stata osservata anche in alcune scimmie di sesso femminile sottoposte a trattamento con l'anticorpo anti-ANGPTL4 (26). Questa osservazione non è del tutto sorprendente in quanto in studi precedenti era stato osservato che topi *Angtl4-/-* alimentati con dieta contenente elevate quantità di grassi saturi per indurre una dislipidemia, sviluppavano un'adenopatia infiammatoria intestinale che poteva evolvere in un quadro di peritonite (27).

È stato suggerito che nei topi *Angtl4-/-* tale quadro infiammatorio fosse dovuto al mancato effetto inibitorio sulla LPL, la cui amentata attività avrebbe prodotto un eccesso di acidi grassi saturi, di cui è nota l'attività pro-infiammatoria (28).

La presenza di lesioni infiammatorie croniche dei linfonodi mesenterici negli animali trattati con anticorpo anti ANGPTL4, ha indotto a verificare se condizioni di difetto genetico di ANGPTL4 nell'uomo, quali si verificano individui portatori di varianti LOF del gene *ANGPTL4,* fossero associate a lesioni infiammatorie nei linfonodi mesenterici.

Un esteso riesame dei dati clinici di questi individui ha dimostrato che solo 1 (9%) dei 17 individui omozigoti per 40KK e 154 (9,3%) dei 1.661 eterozigoti E40K avevano manifestato segni di una adenopatia addominale. Tuttavia la presenza di tale adenopatia è stata riscontrata anche in 3.381 (9,3%) su 41.777 individui non portatori di mutazioni LOF di ANGPTL4. Nessuna differenza è stata segnalata tra portatori e non portatori riguardo la presenza di manifestazioni addominali importanti quali, ascite, peritonite, malassorbimento intestinale, dolori addominali ricorrenti, o diarrea cronica (26).

Quindi al momento questa complicanza infiammatoria osservata nei modelli animali dopo trattamento inattivante ANGPTL4 con REGN1001, non sembra da ascriversi all'inattivazione di ANGPTL4, in quanto non rilevata essere più frequente nei soggetti portatori di varianti LOF di

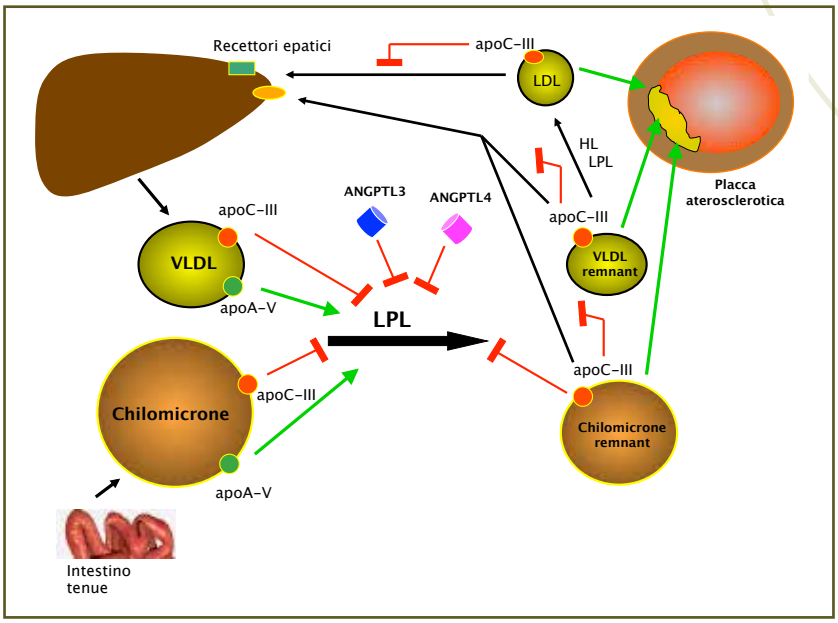

Figura 6 - Secrezione e catabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi. La figura mostra il ruolo chiave della cascata lipolitica mediata dalla Lipasi Lipoproteica (LPL) nel metabolismo di queste lipoproteine. La LPL è inibita da una serie di fattori (quali ApoC-III, ANGPTL3 ed ANGPTL4). Strategie terapeutiche finalizzate a ridurre i livelli o inattivare la funzione degli inibitori della LPL (come ANGPTL3 e ANGPTL4) determinano un aumento della cascata lipolitica accelerando il turnover delle lipoproteine ricche in trigliceridi. Questo processo porta ad una riduzione dei livelli plasmatici di queste lipoproteine ed una minore esposizione delle arterie a loro effetti pro-aterogeni

ANGPTL4. Tuttavia ulteriori studi sugli effetti a lungo termine del trattamento con REGN1001 sono necessari per verificare in via definitiva se questa complicanza infiammatoria sia ascrivibile ad un difetto di ANGPTL4.

CONCLUSIONI

In conclusione le varianti genomiche con perdita di funzione che inattivano l'ANGPTL3 e l'ANGPTL4 sono associate nell'uomo ad un profilo lipidico più favorevole e, nel caso di ANGPTL4 ad una riduzione del rischio di CHD. Ciò ha suggerito l'ipotesi che l'inattivazione di ANGPTL3 e di ANGPTL4 mediata da anticorpi monoclonali potesse rappresentare una strategia terapeutica efficace nelle ipertrigliceridemie e nelle iperlipidemie miste (*Figura 6*).
L'impiego di anticorpi monoclonali specifici in modelli animali ha mostrato una riduzione consistente del livello di lipoproteine aterogene e posto le basi biologiche per studi di FaseI/II nell'uomo (29).

Glossario

ANGPTL3: Angiopoietin-Like-Protein 3 umana,
***ANGPTL3*:** Gene codificante la ANGPTL3 umana
Angptl3: Angiopoietin-like protein 3 animale
***Angptl3*:** Gene codificatne la Angptl3 animale
Topi *Angptl3-/-*: Topi in cui è stato inattivato il gene *Angptl3*
ANGPTL4: Angiopoietin-Like Protein 4 umana
***ANGPTL4*:** Gene codificante la ANGPTL4 umana
Angptl4: Angiopoietin-like protein 4 animale
***Angptl4*:** Gene codificante la Angptl4 animale
Topi *Angptl4-/-*: Topi in cui è stato inattivato il gene *Angptl4*
Topi *Apoe-/-*: Topi in cui è stato inattivato il gene *Apoe* (codificante l'apolipoproteina E)
Topi *Ldlr-/-*: Topi in cui è stato inattivato il gene *Ldlr* (codificante il recettore delle LDL)
Topi *Lrp1-/-*: Topi in cui è stato inattivato il gene *Lrp1* (codificante la LDl receptor related protein 1, recettore per chilomicroni remnants)
Topi *Lipg-/-*: Topi in cui è stato inattivato il gene *Lipg* (codificante la Lipasi Endoteliale)
Topi db/db: Ceppo di topi diabetici, obesi ed iperlipidemici
LPL: Lipasi Lipoproteica
EL: Lipasi endoteliale

RIASSUNTO

Negli ultimi cinque anni è progressivamente emerso il ruolo metabolico di alcune molecole appartenenti alla famiglia delle "Angiopoietin-Like Proteins" (ANGPTLs). In particolare l'Angiopoietin-Like Protein 3 (ANGPTL3) e l' Angiopoietin-Like Protein-4 (ANGPTL4) rivestono un ruolo importante nel metabolismo lipoproteico. L' ANGPTL 3 è un inibitore della Lipasi Lipoproteica (LPL) e della Lipasi Endoteliale (EL), favorisce la secrezione epatica dei trigliceridi nelle VLDL (VLDL-TG) e controlla la rimozione non-recettore mediata delle LDL dal sangue. Il deficit di ANGPTL3 dovuto nell'uomo a varianti genetiche con perdita di funzione o a seguito di inattivazione genica nel topo, è associato ad una marcata riduzione dei livelli plasmatici di VLDL, LDL e HDL (ipolipidemia combinata). Varianti genetiche con perdita di funzione di ANGPTL4 nell'uomo ed l'inattivazione genica nei modelli animali è associata ad una cospicua riduzione delle lipoproteine contenenti trigliceridi ed un modesto ma significativo incremento dei livelli di HDL. Queste osservazioni hanno generato l'ipotesi che l'inibizione di ANGPTL3 o di ANGPTL4 con un anticorpo monoclonale fosse una strategia terapeutica efficace per il trattamento delle ipertrigliceridemie o delle iperlipidemie miste. Alcuni studi recenti condotti in modelli animali, inclusi primati non umani, hanno dimostrato che il trattamento a breve termine con anticorpi monoclonali anti- ANGPTL3 o anti- ANGPTL4 umana, si associa ad un'aumentata attivazione della LPL ed una significativa riduzione dei livelli plasmatici di lipoproteine contenenti trigliceridi, senza apparenti effetti collaterali di rilievo. Infine uno studio pilota condotto su 4 pazienti con ipercolesterolemia familiare (FH) omozigote ha mostrato che il trattamento a breve termine con anticorpo anti-ANGPTL3 induce una significativa riduzione dei livelli plasmatici di LDL, aprendo nuove prospettive nel trattamento delle gravi ipercolesterolemie genetiche. Queste osservazioni sono da intendersi, al momento, come una "dimostrazione di principio" che ANGPTL3 ed ANGPTL4 possono considerarsi nuovi bersagli terapeutici nel trattamento delle dislipidemie aterogene.

Parole chiave: *Angiopoietin-like protein 3; Angiopoietin-like protein 4; Ipolipidemia Familiare Combinata; Lipasi Lipoproteica; Lipasi Endoteliale; Ipertrigliceridemie; Iperlipidemie Miste.*

BIBLIOGRAFIA

1. Dijk W, Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins. Curr Opin Lipidol. 2016; 27: 249-256.
2. Zhang R. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. Open Biol. 2016; 6: 150272.
3. Calandra S., Tarugi P, Averna M, Bertolini S. Familial Combined Hypolipidemia due to mutations in the ANGPTL3 gene. Clin Lipidol. 2013; 8: 81-95.
4. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia N Engl J Med. 2010; 363: 2220-2227.
5. Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, et al. Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. Circ Cardiovasc Genet. 2012; 5: 42-50.
6. Minicocci I, Montali A, Robciuc MR, et al. Mutations in the ANGPTL3 gene and familial combined hypolipidemia: a clinical and biochemical characterization. J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97: E1266-1275.
7. Minicocci I, Santini S, Cantisani V, et al.Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. J Lipid Res. 2013; 54: 3481-3490.
8. Arca M, Minicocci I, Maranghi M. The angiopoietin-like protein 3: a hepatokine with expanding role in metabolism. Curr Opin Lipidol. 2013; 24: 313-320.
9. Lee EC, Desai U, Gololobov G, et al. Identification of a new functional domain in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). J Biol Chem. 2009; 284: 13735-13745.
10. Robciuc MR, Maranghi M, Lahikainen A, et al. Angptl3 deficiency is associated with increased insulin sensitivity, lipoprotein lipase activity, and decreased serum free fatty acids Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33: 1706-1713.
11. Liu J, Afroza H, Rader DJ, Jin W. Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. J Biol Chem. 2010; 285: 27561-27570.
12. Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, et al. Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL

cholesterol through suppression of endothelial lipase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27: 366-372.
13. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. Biochim Biophys Acta. 2014; 1841: 919-933.
14. Tikka A, Jauhiainen M. The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism. Endocrine. 2916; 52: 187-193.
15. Gryn SE, Hegele RA. Novel therapeutics in hypertriglyceridemia. Curr Opin Lipidol. 2015; 26: 484-491.
16. Gusarova V, Alexa CA, Wang Y, et al. ANGPTL3 blockade with a human monoclonal antibody reduces plasma lipids in dyslipidemic mice and monkeys. J Lipid Res. 2015; 56: 1308-1317.
17. Wang Y, Gusarova V, Banfi S, et al. Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion. J Lipid Res. 2015; 56: 1296-1307.
18. Gaudet D, Gipe DA, Khoury É et al. Safety and efficacy of evinacumab, a monoclonal antibody to ANGPTL3, in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: a single arm, open-label, proof of concept study. (abstract, oral presentation). 84th Congress of the European Atherosclerosis Society, Mat 29. 21 June, 2016 Innsbruck, Austria
19. Chi X, Shetty SK, Shows HW, et al. Angiopoietin-like 4 modifies the interactions between lipoprotein lipase and its endothelial cell transporter GPIHBP1. J Biol Chem. 2015; 290: 11865-11877.
20. Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, et al. Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. Nat Genet. 2007; 39: 513-516.
21. Yin W, Romeo S, Chang S, et al. Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function. J Biol Chem. 2009; 284: 13213-13222.
22. Surakka I, Horikoshi M, Mägi R, et al. ENGAGE Consortium. The impact of low-frequency and rare variants on lipid levels. Nat Genet. 2015; 47: 589-597.
23. van Leeuwen EM, Sabo A, Bis JC, et al. Meta-analysis of 49 549 individuals imputed with the 1000 Genomes Project reveals an exonic damaging variant in ANGPTL4 determining fasting TG levels. J Med Genet. 2016 (in stampa).
24. Helgadottir A, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, et al. Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease. Nat Genet. 2016 (in stampa).
25. Myocardial Infarction Genetics and CARDIoGRAM Exome Consortia Investigators. Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease. N Engl J Med. 2016; 374: 1134-1144.
26. Dewey FE, Gusarova V, O'Dushlaine C, et al. Inactivating Variants in ANGPTL4 and Risk of Coronary Artery Disease. N Engl J Med. 2016; 374: 1123-1133.
27. Desai U, Lee EC, Chung K, et al Lipid-lowering effects of anti-angiopoietin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiopoietin-like 4 knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104: 11766-11771.
28. Lichtenstein L, Mattijssen F, de Wit NJ, et al. Angptl4 protects against severe proinflammatory effects of saturated fat by inhibiting fatty acid uptake into mesenteric lymph node macrophages. Cell Metab. 2010; 12: 580-592.
29. Dallinga-Thie GM, Kroon J, Borén J, Chapman MJ. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Remnants: Targets for Therapy? Curr Cardiol Rep. 2016; 18: 67.