

TERAPIA

# IL RUOLO DI ANGPTL3 COME TARGET TERAPEUTICO NELLE DISLIPIDEMIE

## The role of ANGPTL3 as a therapeutic target in dyslipidemias

LAURA D'ERASMO<sup>1</sup>, ANDREA BARAGETTI<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale di Precisione, Sapienza Università di Roma;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano;

<sup>3</sup>IRCCS Multimedica, Milano

### SUMMARY

Angiopoietin-3 (ANGPTL3) is an important inhibitor of the activity of lipoprotein lipase and endothelial lipase, thus representing a crucial regulator for the catabolism of very low-density lipoproteins rich in triglycerides (VLDL) which, by virtue of their residual cholesterol "remnant", exert significant pro-inflammatory and pro-atherogenic effects on the vascular endothelium.

Pre-clinical evidence (mouse models of ANGPTL3 "knock-out") have shown that the genetic absence of this mediator is associated with robust reductions in plasma triglycerides and LDL cholesterol even in the absence of the LDL receptor. This observation was crucial in considering this target for the treatment of homozygous forms of familial hypercholesterolemia (FH) resistant to current therapies. A monoclonal antibody (Evinacumab) directed against the circulating form of the protein and an antisense oligonucleotide for gene transcript inhibition (Vupanorsen) were therefore developed. Both options are providing compelling results in terms of both efficacy and safety in phase I, phase II and phase III studies (the latter for Evinacumab). Many data are still to be acquired, especially those concerning the long-term anti-atherosclerotic effect, but there is a lot of expectation on this target for which, for the first time in the cardiovascular field, we have come very close to gene editing option through CRISPR-Cas9. This review aims to summarize both the molecular bases and the successes, the critical aspects and those to be defined regarding the development of this therapeutic perspective, so promising for severe dyslipidemias for which an effective therapeutic alternative is currently lacking.

**Keyword:** *Angiopoietin-3, Homozygous Familial Hypercholesterolemia, Hypertriglyceridemia, monoclonal antibodies, antisense oligonucleotides, CRISPR-Cas9.*

### Introduzione

Elevati livelli di colesterolo nelle lipoproteine a bassa densità (LDL-C) sono un fattore di rischio noto per malattia cardiovascolare aterosclerotica (ASCVD). La forte associazione causale tra il plasma LDL-C e l'ASCVD costituisce la base per l'uso di te-

*Indirizzi per la corrispondenza*

Laura D'Erasmus

E-mail: laura.derasmus@uniroma1.it

Andrea Baragetti

E-mail: andrea.baragetti@unimi.it

rapie aggressive volte a ridurre LDL-C in particolare negli individui ad alto rischio di ASCVD. Attualmente diverse terapie sono disponibili per ridurre la colesterolemia nella maggior parte delle persone: statine, ezetimibe e inibitori di *Pro-Protein Converte* *tase Subtilisin-Kexin type 9* (PCSK9). Queste terapie sono efficaci e sono da considerare dei mezzi terapeutici per un tempestivo ed efficace trattamento dei pazienti ad alto rischio e molto alto rischio cardiovascolare secondo le linee guida internazionali (1). Tuttavia, rimane ancora oggi una non trascurabile parte di questi pazienti per i quali queste opzioni terapeutiche mostrano limitati, se non scarsi, risultati terapeutici. Tra queste categorie sicuramente sono da annoverare i pazienti con ipercolesterolemia severa, i soggetti portatori di mutazioni di geni che codificano per il recettore delle lipoproteine LDL, per PCSK9 o per Apolipoproteina B (ApoB) su entrambi gli alleli (Ipercolesterolemia Familiare Omozigote (HoFH)) oppure su uno dei due alleli nella forma *null* (HeFH). Per tutti questi pazienti che presentano evidenti resistenze alle terapie convenzionali, vi è un crescente interesse a identificare nuovi trattamenti che possano ridurre efficacemente i livelli plasmatici di LDL-C.

È stato riconosciuto, più recentemente, che il colesterolo plasmatico, benché rimanga il marcatore causale per ACVD, riflette la quantità di lipoproteina che maggiormente lo trasporta (LDL), ma è meno rappresentativo delle lipoproteine circolanti contenenti ApoB, che sono “precursori” delle LDL (2). Infatti, le lipoproteine di immediata derivazione epatica a molto bassa densità (o “VLDL”) e quelle a intensità intermedia (IDL) subiscono in periferia l’attività lipolitica della lipasi lipoproteica (LPL) e di quella endoteliale (EL), progressivamente diventando LDL (3). LPL e EL “scaricano” in questo modo il contenuto di tri-

gliceridi in queste lipoproteine e rendono sempre maggiore la quota relativa del colesterolo residuo (“remnant”) (4). In aggiunta a questi aspetti, tutte queste lipoproteine sono in grado di penetrare nell’endotelio vascolare, causando le medesime reazioni infiammatorie e aterosclerotiche indotte dalle LDL (5–7).

La quota di queste lipoproteine è consistente e clinicamente rilevante, se consideriamo che i prelievi plasmatici per il controllo routinario del profilo lipidico sono comunemente prescritti a digiuno, non permettendo quindi una “fotografia” realistica della quantità di VLDL e IDL che sono prodotte in misura significativa nella condizione “non a digiuno” o, ancor più, nella fase di “lipemia postprandiale”. Nella fase di lipemia postprandiale in particolare, se non si considera l’effimero aumento di chilomicroni di origine intestinale (che si esaurisce nell’arco di mezz’ora o al più un’ora) si osservano dei significativi aumenti di VLDL che persistono dalle quattro alle sei ore dopo il consumo di un pasto ad elevato contenuto calorico (8). Questa condizione non è sovralfisiologica, in quanto recenti proiezioni epidemiologiche hanno indicato che nelle popolazioni odierne a più alto rischio ASCVD si consumano cibi e pietanze contenenti tra i 20-40 g di grassi alimentari per ogni pasto e che vengono consumati dai tre ai quattro pasti al giorno (9,10).

Questo rende immediata la conclusione che la sola considerazione di LDL-C, non solo a scopo diagnostico e prognostico, ma anche nell’ottica di un intervento terapeutico, precluda la valutazione di un iterativo carico o “burden” infiammatorio, che certamente complica l’evoluzione del rischio ASCVD.

Tutti gli studi di popolazione e gli approcci genetici di randomizzazione mendeliana che hanno supportato in maniera robusta la causalità della “trigliceridemia non

a digiuno” per l'aumentato rischio ASCVD (11–13) sono da considerarsi quindi delle importanti lezioni in ambito lipidologico che testimoniano, di riflesso, la rilevanza dell'accumulo di colesterolo non soltanto nelle LDL ma anche, in maniera più generale, in tutte le lipoproteine contenenti ApoB.

Quali strumenti la ricerca farmacologica ha sviluppato per un approccio maggiormente comprensivo nella riduzione delle lipoproteine contenenti ApoB, specialmente in quei casi di “bisogno clinico insoddisfatto” (ipercolesterolemia severa e ipertrigliceridemia)?

Tra i vari approcci rimasti “al palo” in fase sperimentale e quelli che hanno soltanto visto da lontano un approdo in fase clinica, l'Angiopietin like-3 (Angptl3) è il *target* che fin da subito ha suscitato interesse in ambito farmacologico e che, ad oggi, ha già mostrato promettenti risultati.

In questa revisione di letteratura, riteniamo di dover innanzitutto ricordare gli aspetti molecolari legati al metabolismo di questa proteina, per poi contestualizzare i dati dei *trial* clinici e suggerire, da ultimo, quali sono gli aspetti ancora mancanti da esplorare.

### La Lipoprotein lipasi e la regolazione del *trafficking* di substrati lipidici

L'evoluzione ha portato ad un meccanismo attraverso il quale il corpo umano immagazzina energia durante i pasti mentre usa l'energia che è stata immagazzinata durante le fasi di carestia. I TG sono la principale forma di lipidi sia da immagazzinare che per fornire energia. Come processo fisiologico fondamentale, i TG sono immagazzinati nel tessuto adiposo bianco (WAT) dopo l'assunzione di cibo, mentre durante digiuno i TG vengono indirizzati ai tessuti che li utilizzano per alimentare il

metabolismo ossidativo che li sostiene (cuore e muscolatura scheletrica) (“partizionamento” dei TG). In circolo, in virtù della loro insolubilità in acqua, i TG vengono trasportati da chilomicroni e VLDL. I chilomicroni sono le lipoproteine di derivazione intestinale e vengono formate dopo un pasto dai TG provenienti dalla dieta a livello dei villi duodenali; al contrario le VLDL vengono prodotte principalmente durante il digiuno da parte del fegato venendo secrete direttamente nel torrente ematico (4,10). Queste VLDL trasportano e distribuiscono i trigliceridi per lo stoccaggio o l'ossidazione. Il partizionamento dei TG tra WAT (stoccaggio) e tessuti ossidativi (per produzione energetica) dipende proprio dalla LPL. La LPL è l'enzima chiave responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi plasmatici e limita la velocità di assorbimento dei trigliceridi sia nei tessuti ossidativi che in quelli di accumulo (14). L'attività postprandiale di LPL aumenta nel WAT, ma diminuisce nei tessuti ossidativi, dirigendo così i TG al WAT per lo stoccaggio (14). A digiuno, l'attività di LPL si riduce a livello del WAT, ma aumenta nei tessuti ossidativi, indirizzando i TG verso muscoli per la produzione di energia (14). Pertanto, la LPL è considerato un *gatekeeper* per la consegna e l'utilizzo dei substrati a livello dei vari tessuti e l'attività LPL è attentamente e accuratamente orchestrata in modo specifico a livello di ogni tessuto.

Per tale motivo diverse proteine sono coinvolte nella regolazione dell'attività dell'LPL (15). Tra queste, si riconoscono le apolipoproteine C1, C2, C3, E e A5 e le proteine simili ad Angiopietina note come ANGPTL3, ANGPTL4 e ANGPTL8. Queste ultime, in particolare, agirebbero in modo coordinato tra di loro regolando, grazie ai loro effetti su LPL, la disponibilità di substrati a livello dei diversi tessuti nella fase di digiuno e/o post-prandiale.

## ANGPTL3 e il metabolismo lipidico

Dalla sua scoperta nel 1999 da parte di Conklin e colleghi (16), Angptl3 è stata considerata un modulatore molto potente delle lipoproteine plasmatiche, in particolar modo regolando i livelli di TG, LDL e colesterolo nelle lipoproteine a alta densità (HDL-C) attraverso un'inibizione dell'attività della LPL (17). È inoltre seminale ricordare che Angptl3 agisce anche come inibitore dell'attività della lipasi endoteliale (EL), un enzima espresso sulla membrana luminale delle cellule endoteliali vascolari e che, mediando il metabolismo di fosfolipidi, contribuisce al rimodellamento del contenuto lipidico e delle dimensioni delle HDL. A livello trascrizionale, il gene ANGPTL3 è regolato da *Liver X receptors (LXRs)* e da *Hepatocyte Nuclear Factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ )* (18). Il primo ne aumenta l'espressione proprio durante la fase di non-digiuno o in risposta a insulina (19) oppure a leptina (20), grazie al legame su una regione specifica nel gene di ANGPTL3; HNF1 $\alpha$  invece inibisce l'espressione ANGPTL3 indirettamente in quanto richiama la mediazione del recettore per l'ormone tiroideo (21).

Angptl3 è una proteina da 70 kDa principalmente espressa e secreta dal fegato (16, 22) e, in misura minore dal rene (16), da cui poi è eliminata (23-25). Angptl3 conserva una regione N-terminale e un *Fibrinogen-like domain (FLD)* nella regione C-terminale, tipica della famiglia delle Angiopietine. Inoltre, Angptl3 è caratterizzata da una struttura aminoacidica (dall'aminoacido 245 a quello 460) omologa a quella del fibrinogeno (per il 40% identica). Infine una sequenza di 16 aminoacidi ("peptide segnale") permette la sua secrezione epatica (26, 27). Il dominio N-terminale è più efficiente nell'inibire l'attività LPL rispetto all'ANGPTL3 a lunghezza intera mentre il dominio C-terminale interagisce con il re-

cettore  $\alpha 3\beta v$  dell'integrina cellulare, possibilmente trasmettendo una segnalazione intracellulare.

Essenziale per l'attività di Angptl3 è la regione *Specific Epitope 1 (SE1)*, un "linker" (lungo dall'amminoacido 32 a quello 55) della porzione N- con quella C-terminale. Questa struttura subisce una attivazione subito dopo la sua secrezione epatica, grazie al clivaggio operato dalla furina PCSK3 all'interno dell'epatocita e da PACE4 (PCSK6) a livello extra-cellulare. In questo modo la forma clivata è rilasciata in circolo e mostra un'affinità di legame e di inibizione dell'attività di LPL superiore rispetto alla forma non clivata (27, 28).

I suoi effetti sul metabolismo dei lipidi furono originariamente identificati in modelli murini di obesità (ceppo KK (KK/SAN)) che esprimevano una forma tronca di ANGPTL3 associata a iperglicemia ed iperinsulinemia. Questi dati hanno suggerito che una perdita di attività di ANGPTL3 si associa a una riduzione dei livelli di TG. Dopo le prime evidenze che hanno confermato come l'ablazione di Angptl3 in modelli murini favorisce la lipolisi del contenuto di TG nelle VLDL e, quindi, il loro catabolismo mediante un'interazione diretta con SE1 (29, 30), è stato più recentemente chiarito con maggior dettaglio che Angptl3 favorisce anche la lipolisi del materiale lipidico specificamente dal WAT (31). Infatti in topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi l'ablazione genetica totale di Angptl3 è sufficiente per ridurre l'accumulo specificamente nel tessuto adiposo (29). L'assenza "full-body" di Angptl3, data da delezione genica di *ANGPTL3*, in modelli murini sottoposti a dieta ad elevato contenuto di grassi non esercita alcun beneficio sull'accumulo ectopico di adiposità nel cuore, muscolatura scheletrica e tessuto adiposo bruno (32). In aggiunta a questi ulteriori aspetti, è sicuramente da sottoli-

neare che l'attività di Angptl3 nell'aumentare il catabolismo delle lipoproteine contenenti ApoB è indipendente da LDLR (33). Questo aspetto molecolare ha posto le basi per il crescente interesse verso questa proteina, con la prospettiva di trattare quei soggetti dove vi sia un completo deficit di questo recettore, ovvero HoFH o altre forme severe di ipercolesterolemia.

In aggiunta a tutti questi aspetti derivati da modelli sperimentali, la rilevanza di Angptl3 nel mediare tutte queste risposte è stata confermata ampiamente da studi di genetica. Infatti, gli studi di associazione genomica (GWAS) sull'uomo hanno ulteriormente rilevato l'aggregazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel gene ANGPTL3 alle variazioni dei TG nella popolazione generale. ANGPTL3 è rimasta una proteina interessante fino a quando Musunuru e colleghi, mediante sequenziamento delle regioni codificanti del DNA (esoma), hanno dimostrato come la perdita di funzione (LOF) in omozigosi (o eterozigosi composta) nel gene ANGPTL3 localizzato sul cromosoma 1p31 si associava ad un fenotipo di ipolipidemia (34). Da allora, diverse famiglie con FHBL2 con mutazioni in ANGPTL3 sono state identificate e studiate attentamente in particolare grazie allo sforzo di alcuni ricercatori italiani che hanno identificato la presenza di un particolare *cluster* di soggetti omozigoti in una cittadina montuosa laziale (Campodiemele) (35, 36). La presenza di questo genotipo si è dimostrato essere associato ad un fenotipo unico che è stato successivamente chiamato ipolipidemia combinata familiare (FHBL2, OMIM #605019). L'FHBL2 è caratterizzata da una marcata riduzione di lipoproteine contenenti ApoA1 e ApoB (VLDL e LDL), un aumento dell'attività della LPL che comporta un accelerato catabolismo VLDL durante la fase di lipemia postprandiale (35, 36). Il meccanismo me-

dante il quale l'inibizione della ANGPTL3 si associa ad una riduzione delle LDL-C è al momento sconosciuta sebbene sembrerebbe essere indipendente dalla via del recettore del LDLR (17). Questo modello umano di carenza di ANGPTL3 ha offerto un modello unico per studiare il meccanismo di azione ANGPTL3 e le conseguenze favorevoli associate alla sua assenza permettendo di caratterizzare molte delle funzioni di questa proteina nell'uomo. L'osservazione relativa agli effetti positivi del deficit di ANGPTL3 non si è tuttavia limitata a verificare il suo effetto sulle lipoproteine. Infatti, studi di GWAS hanno successivamente evidenziato che i soggetti portatori di varianti LOF in ANGPTL3 presentano un rischio ridotto di malattia cardiovascolare aterosclerotica (37).

Complessivamente appare chiaro come tutti questi dati abbiano stabilito la logica per lo sviluppo di strategie farmacologiche per inattivare ANGPTL3 e ridurre i livelli plasmatici di lipoproteine aterogene e, potenzialmente, il rischio cardiovascolare.

### Strategie farmacologiche di inibizione di ANGPTL3

Ad oggi, sono stati utilizzati due diversi approcci per inattivare ANGPTL3 (38):

- la somministrazione di un anticorpo monoclonale (mAb) umano contro la forma proteica circolante di Angptl3 (Evinacumab);
- un oligonucleotide antisense (ASOs) che colpisce l'espressione del gene ANGPTL3 (Vupanorsen) (*Figura 1*).

Entrambi questi approcci si sono dimostrati sin dall'inizio già molto convincenti nel modello murino a garantire riduzioni robuste dei livelli plasmatici di TG, di LDL e di HDL-C.

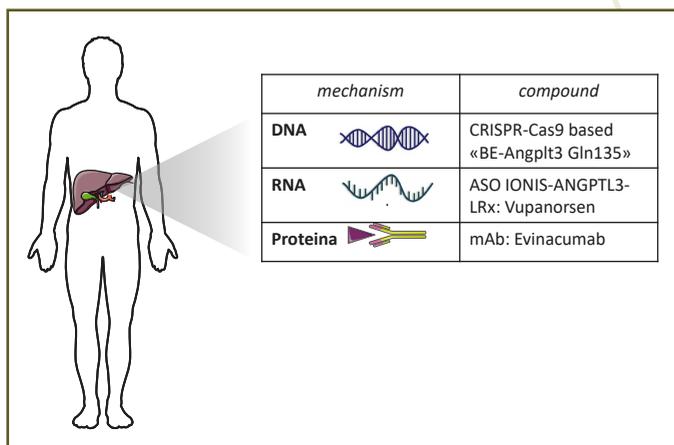
Nella restante parte di questa rassegna ci occuperemo di esaminare le evidenze

dell'utilizzo di queste nuove strategie terapeutiche nell'uomo.

### Evinacumab

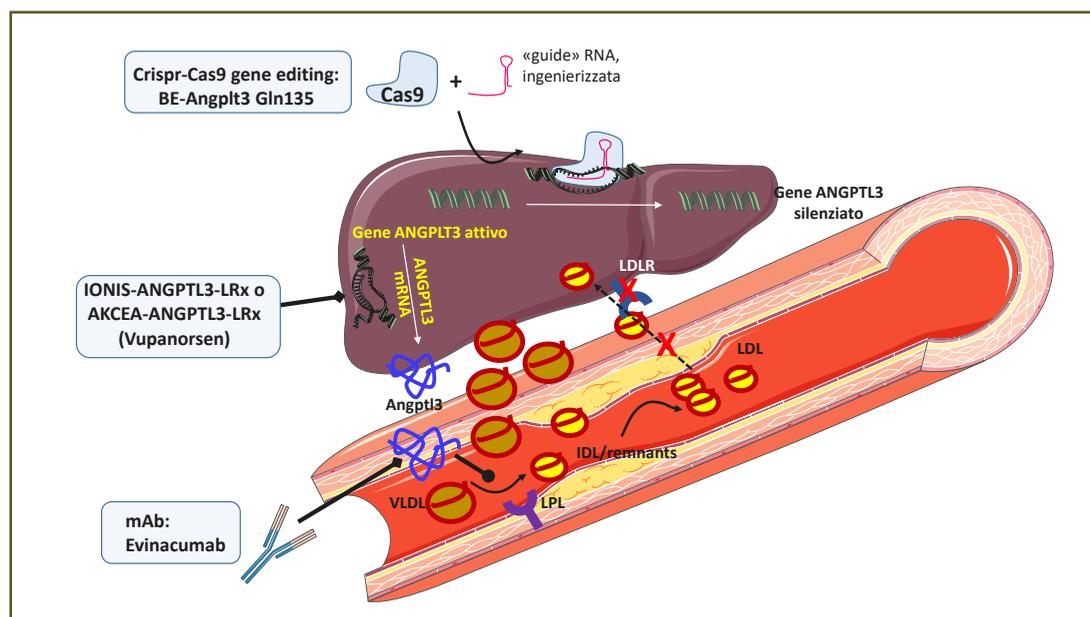
L'anticorpo monoclonale REGN1500 (Evinacumab) è un anticorpo completamente umanizzato che lega con alta affinità l'ANGPTL3 (Figura 2). In questo paragrafo sono riassunte le principali evidenze relative l'efficacia e la sicurezza di Evinacumab nell'uomo (Tabella 1).

Gli studi clinici di fase I hanno dimostrato che la somministrazione di Evinacumab (75-250 mg per via sottocutanea o 5-20 mg/kg per via endovenosa) a 83 volontari umani sani (39) e con ipertrigliceridemia da lieve a moderata (150-450 mg/dl) o LDL-C 100 mg/dl (40) si associava ad



**Figura 1** - Opzioni terapeutiche contro Angptl3, suddivise per target molecolare (DNA, RNA e proteina circolante).

Elenco riassuntivo delle tre opzioni dirette contro Angptl3, tutte caratterizzate da completa estrazione epatica. Le tre opzioni in figura sono suddivise per il target molecolare contro cui sono dirette (sequenza genica di ANGPTL3 “DNA”; trascritto di ANGPTL3 “RNA”; proteina circolante contro cui l'anticorpo monoclonale è diretto).



**Figura 2** - Razionale delle tre opzioni terapeutiche contro ANGPTL3 nell'ipercolesterolemia severa con deficit del recettore delle LDL.

La figura schematizza il razionale dell'approccio di *gene editing* di ANGPTL3 (CRISPR-Cas9), quello diretto contro il trascritto del gene (Vupanorsen) e quello diretto contro la proteina circolante (Evinacumab). Il simbolo "X" rosso sul recettore delle LDL (LDLR) indica assenza di questo recettore, raffigurando le condizioni di ipercolesterolemia familiare omozigote causate da completo deficit di LDLR. "LPL" = Lipoproteina Lipasi; "LDLR" = Recettore delle LDL; "VLDL" = Lipoproteine a molto bassa densità; "IDL/remnants" = Lipoproteine a densità intermedia; "LDL" = Lipoproteine a bassa densità; "mAb" = anticorpo monoclonale; "mRNA" = RNA messaggero.

**Tabella 1 - Riassunto degli studi di Fase I, di Fase II e di Fase III che hanno valutato l'effetto di Evinacumab sui principali marcatori lipidici circolanti.**

La tabella riporta, sia per gli studi di Fase I sia per quelli di Fase II, il codice (NCT), il riassunto del disegno e i risultati principali (riduzioni medie dei diversi marcatori lipidici).

Studi di Fase-I		
Studio	Disegno	Risultati principali
NCT01749878	83 volontari sani; Evinacumab (75-250 mg per via sottocutanea o 5-20 mg/kg per via endovenosa)	TG: -76% LDL-C: -23%
NCT01749878 NCT02107872	Soggetti con TG: 150-450 mg/dl e LDL-C $\geq$ 100 mg/dl. n=83 con single ascending dose study [SAD]; n=56 for multiple ascending dose study [MAD])	TG: -88,2% (dose e.v. 20 mg/kg ogni 4 settimane).
Studi di Fase-II		
NCT03452228 NCT04863014	(n=17): FCS con mutazioni <i>loss-of-function</i> su entrambi gli alleli in APOA5, APOC2, GPIHBP1, LMF1, o LPL. (n=15): Sindrome chilomicronemica multifattoriale (MCS) con mutazioni in eterozigosi sui geni APOA5, APOC2, GPIHBP1, LMF1, or LPL. (n=19): MCS senza mutazioni su LPL.	TG: -81,7% dipendentemente da genotipo. Pazienti FCS con mutazioni sul gene LPL responsivi.
NCT03175367	FH portatori di mutazioni in eterozigosi resistenti a terapia che presentavano, alla baseline LDL-C 70-100 mg/dl con aterosclerosi oppure LDL-C sopra 100 mg/dl senza aterosclerosi. Dosi testate: 450 mg/w; 300 mg/w; 200 mg/2w sottocute. 15 mg/kg o 5 mg/kg intravenosa.	Riduzioni LDL-C: -56,0%: con 450 mg/w -52,9%: con 300 mg/w -38,5%: con 200 mg/2w -50,5%: con 15 mg/kg -24,2%: con 5 mg/kg
NCT02265952	9 HoFH (mutazioni su gene LDLR).	Riduzione LDL-C: -58,18%
Studi di Fase-III		
NCT03399786 ELIPSE HoFH	65 HoFH con infusione intravenosa 15 mg/kg.	Riduzione LDL-C: -47,1%

una riduzione dose-dipendente placebo-controllato dei TG e delle LDL-C fino al 76% e 23% rispettivamente.

Due differenti studi di fase I hanno testato Evinacumab nei pazienti con ipertrigliceridemia moderata (TG 150-450 mg/dL) e LDL-C >100 mg/dl (40) (Tabella 1). Entrambi gli studi hanno dimostrato una consistente riduzione della trigliceridemia con un picco tra il giorno 11 e 15 dall'infusione. Il migliore risultato in termini di trigliceridemia si è ottenuto con la dose endovenosa di 20 mg/kg ogni 4 settimane (-88.2%). I più comuni effetti collaterali sono stati lievi e tra questi in 4 soggetti si è rilevata una elevazione dei livelli di transaminasi (AST or ALT > 3 volte ULN)

mentre in 6 soggetti è stata rilevata una elevazione dei valori di CPK (>3 volte ULN). Nonostante al momento non vi siano dati disponibili relativamente all'uso dell'Evinacumab delle forme più severe di ipertrigliceridemia, siamo in attesa dei risultati di due studi di fase II (NCT03452228 e NCT04863014 (Tabella 1)) in cui il farmaco è stato sperimentato nei soggetti con ipertrigliceridemia severa e storia di pancreatite acuta. Risultati preliminari sono stati presentati nel congresso dell'American College of Cardiology 2021 (41) (Tabella 1) dimostrando come questo farmaco sia in grado di determinare una riduzione dei trigliceridi fino all'81.7% e che questa azione è altamente dipendente dal

genotipo sottostante risultando irrilevante nei pazienti con sindrome chilomicronemica familiare, portatori di mutazioni con perdita di funzione del gene che codifica per LPL. Questo dato a riprova del fatto che l'inibizione di ANGPTL3 determina un effetto sulla trigliceridemia solo in presenza di un normale funzionamento del meccanismo di idrolisi LPL mediato.

Contemporaneamente, considerati i risultati sui livelli di LDL-C sono stati effettuati ulteriori studi volti a sperimentare il suo utilizzo nei pazienti ipercolesterolemici. L'Evinacumab, pertanto, è stato sperimentato in uno studio di fase II in doppio cieco randomizzato (42), controllato con placebo, in pazienti con ipercolesterolemia resistente con o senza ipercolesterolemia familiare (Tabella 1). L'ipercolesterolemia resistente era definita come LDL-C >70 mg/dl in soggetti con ASCVD e > 100 mg/dl senza ASCVD. In questi pazienti l'utilizzo di Evinacumab si associava ad una riduzione di LDL-C oltre il 50% alle dosi maggiori con un'incidenza di effetti collaterali che si aggirava tra il 3-16%. Evinacumab è stato testato in un altro studio di fase II (43), in aperto, *proof-of-concept* che coinvolgeva nove pazienti con HoFH. L'HoFH è un disordine genetico raro, a trasmissione autosomica dominante, associato a una elevazione severa dei livelli di LDL-C e, conseguentemente, aterosclerosi accelerata. I risultati di questo studio hanno dimostrato come la terapia con Evinacumab in questi pazienti ha determinato una riduzione marcata nei livelli di LDL-C, di TG e di HDL-C di circa 50, 47 e 36% rispettivamente. Questi dati hanno inoltre dimostrato sorprendentemente come l'efficacia dell'inibizione di ANGPTL3 sui livelli di LDL-C sia indipendente dall'attività residua del recettore dell'LDL epatico sfruttando un meccanismo indipendente da questa via (44). Considerati questi ri-

sultati promettenti, l'Evinacumab è stato testato nei pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote (studio ELIPSE HoFH (Tabella 1)). Lo studio ELIPSE è uno studio di fase III (45), in doppio cieco controllato con placebo, volto a valutare l'efficacia e la sicurezza del Evinacumab in 65 pazienti con HoFH indipendentemente dal genotipo e dalla terapia farmacologica ipolipemizzante di *background* (LLT). I risultati di questo studio hanno evidenziato che la somministrazione mensile di Evinacumab *on top* alla terapia ipolipemizzante di *background* ha determinato una riduzione della colesterolemia a 24 settimane del 49%. Ancora più importante, la riduzione dell'LDL-C era indipendente dall'attività residua dell'LDLR con i pazienti HoFH portatori di varianti LDLR null/null che presentavano una riduzione dell'LDL-C di circa il 70% rispetto al placebo. L'analisi combinata della sicurezza degli studi controllati con placebo con Evinacumab ha dimostrato che le reazioni avverse più comuni (> 3% dei pazienti) dopo 24 settimane di terapia erano rinofaringite (16% vs 13%), malattia simile all'influenza (7% vs 6%), vertigini (6% vs 0%), rinorrea (5% vs 0%), nausea (5% vs 2%), dolore alle estremità (4% vs 0% placebo), e astenia (4% vs 0%). Pertanto, l'Evinacumab può offrire un'opzione sicura ed efficace per migliorare significativamente il controllo delle lipoproteine aterogene e quindi ridurre gli eventi cardiovascolari nei pazienti con HoFH. Sulla base di queste evidenze, la Food and Drug Administration (FDA) e la European Medicine Agency (EMA) hanno approvato la terapia con Evinacumab (Evkeeza) come trattamento aggiuntivo per i pazienti HoFH di età pari o superiore a 12 anni (46). La dose raccomandata è di 15 mg/kg somministrata per infusione endovenosa nell'arco di 60 minuti una volta al mese (ogni 4 settimane).

## Vupanorsen

In modelli murini, l'inibizione duale dell'mRNA di *ANGPTL3* e PCSK9 mediante siRNA iniettato in topi con deficit di LDLR in eterozigosi induceva una riduzione di LDL-C che era superiore e cumulativa rispetto a quanto ottenuto con l'inibizione del solo RNA messaggero mRNA per PCSK9 o del solo mRNA per *ANGPTL3* (38). Inoltre, il silenziamento dell'RNA di *ANGPTL3*, sempre nel modello murino, ha mostrato una importante riduzione nel numero e nella dimensione delle VLDL (47), mentre non garantiva una robusta riduzione di LDL-C in modelli murini con delezione di EL (48). Queste preliminari osservazioni hanno suggerito due punti fondamentali:

- direzionare il trattamento contro il trascritto epatico di *ANGPTL3* permette delle convincenti riduzioni di LDL-C, anche in assenza di LDLR;
- tale effetto è per lo più conseguente all'aumento del catabolismo di tutte le lipoproteine contenenti ApoB (38). Due conclusioni importanti che hanno aperto la strada verso lo sviluppo del primo oligonucleotide antisense (ASO) diretto contro l'mRNA di *ANGPTL3*: Vupanorsen (IONIS-*ANGPTL3*-LRx o AKCEA-*ANGPTL3*-LRx) (Figura 2).

Questo ASO è di "seconda generazione" in quanto coniugato a una molecola di N-Acetylgalactosamine ("Gal-Nac) che permette una completa estrazione epatica del prodotto, oltre che una potenza quindi volte superiore rispetto allo stesso prodotto non coniugato (38). L'efficacia di questo prodotto e la sua indipendenza dall'attività residua del recettore delle LDL si è palesata sin da subito in modelli murini di FH (LDLR knock-out) in cui si osservano riduzioni di TG fino a -63% rispetto a *LDLR knock-out* non trattati (47).

L'ancor maggiore specificità epatica permette, inoltre, un importante profilo farmacocinetico di Vupanorsen: questo ASO dimostra una emivita di circa 3-5 settimane con un aumento lineare, dose-dipendente, della concentrazione massima (Cmax) tra 10-60 mg/dose, grazie anche a un ottimo profilo di volume di distribuzione (49).

Tutti questi vantaggi forniti dalla tecnologia Gal-Nac permettono anche un accettabile punto di vista di *safety* e dosi minori necessari per ottenere benefici terapeutici con questo ASO rispetto alle forme non coniugate. Si riducono così le insorgenze di trombocitopenia, principale effetto collaterale osservato, in senso lato, con tutte i prodotti ASO di prima generazione e non è specifico per il trattamento di *ANGPTL3* (38).

In questo paragrafo sono riassunte le principali evidenze relative a efficacia e sicurezza di Vupanorsen nell'uomo (Tabella 2).

Vupanorsen è stato testato per la prima volta in uno studio clinico randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, di fase I (49), progettato per valutare la sicurezza, il profilo degli effetti collaterali, la farmacocinetica e la farmacodinamica di dosi singole crescenti e dosi multiple crescenti di *ANGPTL3*-LRx in 44 adulti affetti da ipertrigliceridemia tra 90-150 o >150 mg/dl a seconda della coorte. I risultati di questo studio hanno indicato che l'inibizione epatica di *ANGPTL3* determinava una riduzione dei trigliceridi (32.2-63.1%), dei livelli di colesterolo di LDL (1.3-32.9%) e dei livelli di apolipoproteina C-III (18.9-58.8%). Successivamente, uno studio di fase II in doppio cieco (50), controllato con placebo, ha testato questo farmaco in un ampio spettro di soggetti (N = 105):

- 1) con elevati livelli di TG plasmatici a digiuno (> 150mg/dL);

**Tabella 2 - Riassunto degli studi di Fase I e di Fase II che hanno valutato l'effetto di Vupanorsen sui principali marcatori lipidici circolanti.**

La tabella riporta, sia per gli studi di Fase I sia per gli studi di Fase II, il codice (NCT), il riassunto sommario del disegno e i risultati principali (riduzioni medie dei diversi marcatori lipidici).

Studi di Fase-I		
Studio	Disegno	Risultati principali
NCT02709850	44 volontari sani (TG 90-150 mg/dl). Studio "single ascending dose" [SAD] 20, 40, o 80 mg sottocute. Associato a studio "multiple ascending dose". [MAD] 10, 20, 40, or 60 mg a settimana per 6 settimane.	TG: - (33,2% - 63,1%) LDL-C: - (1,3% - 32,9%) VLDL-C: - (27,9% - 60,0%) Non-HDL-C: - (10% - 36%) ApoB: - (3,4% - 25,7%) ApoCIII: - (18,9% - 58,8%)
Studi di Fase-II		
Gaudet D et al. Eur Heart J 2020	105 pazienti con TG >150 mg/dL, diabete di tipo 2 e steatosi epatica. 6 mesi con 40 o 80 mg ogni 4 settimane (Q4W) o 20 mg ogni settimana (QW).	TG: -36% con 40 mg Q4W TG: -53% con 80 mg Q4W TG: -47% con 20 mg QW Colesterolo totale: -19% con 80 Q4W; colesterolo "remnant": -38% con 80 mg Q4W non-HDL-C: -18% con 80 mg Q4W.
NCT03360747	3 pazienti FCS	dati ongoing

2) diabete di tipo 2 con HbA1c >6,5% e 10%;  
3) steatosi epatica [frazione di grasso epatico (HFF) >8% quantizzata mediante risonanza magnetica (MRI)].

I pazienti sono stati trattati per 6 mesi con placebo o Vupanorsen somministrato per via sottocutanea alle dosi di 40 o 80 mg ogni 4 settimane (Q4W), o 20 mg ogni settimana (QW). I risultati di questo studio hanno indicato che la riduzione massima dei livelli di trigliceridi del 53% rispetto alla *baseline* veniva ottenuta con la dose di 80mg Q4W ed era associata a una riduzione di LDL-C di circa 7%. Va notato che il trattamento con Vupanorsen non è stato associato ad alcun cambiamento significativo nella conta piastrinica con reazioni a livello del sito d'iniezione generalmente lievi. Uno studio di fase II, recentemente concluso, ha valutato l'efficacia del Vupanorsen nel ridurre i livelli dei trigliceridi nei soggetti con sindrome chilomicronemica familiare (NCT03360747 (51)), ma i risultati non sono al momento disponibili. Le aziende produttrici hanno recentemente

annunciato la sospensione del programma di sviluppo clinico di Vupanorsen (52). L'azienda ha preso questa decisione dopo una revisione approfondita dei dati derivanti dallo studio di fase 2b, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, di soggetti con dislipidemia trattati con statine - noto anche come TRANSLATE-TIMI 70 dall'acronimo di *TaRgeting ANGPTL3 with an aNTiSense oLigonucleotide in AdultS with dyslipidemia* (53). Lo studio ha raggiunto il suo obiettivo primario di verificare la presenza di una riduzione statisticamente significativa del "colesterolo non-HDL" ("non-HDL-C", sottrazione matematica di HDL-C dal colesterolo totale plasmatico) e dei trigliceridi e di angptl3. Tuttavia, l'entità della riduzione di non-HDL-C e dei TG osservata non ha sostenuto la continuazione del programma di sviluppo clinico né per la riduzione del rischio cardiovascolare, né per l'ipertrigliceridemia severa. Inoltre, sorprendentemente, il trattamento con Vupanorsen è stato associato con un aumen-

to dose dipendente della steatosi epatica e le dosi elevate sono state associate con un aumento significativo nei livelli di alanina aminotransferasi (ALT) e aminotransferasi dell'aspartato (AST).

### Il futuro di *ANGPTL3*: approccio di *gene editing* mediante tecnologia CRISPR-Cas9

La tecnologia "CRISPR-Cas9" scoperto nel 2012, si basa sul meccanismo evolutivamente conservato dei batteri nel produrre trascritti genici per proteggersi da infezioni di DNA esogeno (54, 55). Infatti, questo sistema nei batteri sfrutta i frammenti di DNA CRISPR che, specificamente in questi procarioti (e.g. *Streptococcus Pyogenes*), "guida" l'attività dell'enzima Cas9 per riconoscere e clivare specifiche sequenze di DNA complementari alla sequenza CRISPR. Una volta riconosciuto l'RNA che contiene la sequenza *spacer*, la proteina Cas9 associata a CRISPR riconosce e taglia il frammento patogeno di DNA e introduce specifiche mutazioni in una sequenza *target* del genoma dell'ospite (55). CRISPR-Cas9 permette una specificità di gran lunga superiore rispetto alle più comuni metodiche di silenziamento con vettori virali, generando tagli sul doppio filamento mirati. Inoltre, a differenza degli approcci virali, CRISPR-Cas9 non richiede più l'assemblaggio di complessi proteici ma soltanto la modifica di poche sequenze nucleotidiche della *guide* di RNA, ulteriormente facilitando la specificità. Quest'ultima caratteristica rende la tecnologia CRISPR-Cas9 utile per il trattamento di molecole di non elevato peso molecolare, codificate da regioni di DNA relativamente piccole; requisito, questo, che si allinea bene per un'applicazione su *Angptl3*.

Il primo sistema CRISPR-Cas9 contro *ANGPTL3* ha rappresentato anche un'im-

portante esperienza che ha posto le basi per miglioramenti più "universali" in ambito biotecnologico. Infatti, nell'intento di trattare *angptl3* con CRISPR-Cas9 per la prima volta è stato utilizzato un più specifico *editor* della Cas9 (chiamato "BE3") (Figura 2). Quest'ultimo è stato concepito per superare gli inconvenienti legati a questa tecnologia (vedasi mutagenesi *on-target* e *off-target* data da insufficiente specificità della *guide* di RNA (38)).

Dopo iniezione di BE3 con *guide* dell'RNA verso il codone Gln-135 del gene *ANGPTL3* (BE3-Angptl3), in modelli murini si osservava una elevata specificità di *gene editing*, con il 35% in più di alleli di *ANGPTL3* editati, senza evidenza di mutagenesi *off-target*. Questo effetto si associava, in vivo, a -50% della proteina *Angptl3* circolante, a -35% di TG a digiuno e a -20% di colesterolo plasmatico.

In topi LDLR knock-out, BE3-Angptl3 riduceva significativamente i TG fino a 56% e il colesterolo fino a 51% (56).

Poco è noto, tuttavia, per ciò che concerne il profilo di *safety* di questa tecnologia. È da ricordare che la rarefazione significativa di cellule ematopoietiche nel midollo osseo riscontrato in topi con deficienza genetica di *ANGPTL3* (knock-out) (57, 58), non si osservava con il sistema di *gene editing*.

### Conclusioni

Sino ad oggi, il trattamento delle forme severe di FH, gli HoFH e i portatori in eterozigosi di *mutazioni null* severe (HeFH) è stato limitato dal meccanismo di azione della maggior parte delle strategie ipolipemizzanti, le quali sono volte a aumentare l'attività di LDLR. La lipoproteina aferesi è stata considerata efficace ad oggi, malgrado il profondo impatto negativo sulla qualità di vita del paziente. D'altro canto, l'evolu-

zione terapeutica della Lomitapide, un farmaco inibitore della *Microsomal Triglycerides Transfer Protein*, MTTP), è risultata complicata dall'accumulo epatico di trigliceridi. In aggiunta, mentre l'utilizzo di anticorpi monoclonali contro PCSK9 ha mostrato un vantaggio in alcune forme severe di *mutazioni null* in eterozigosi, che mantengono ancora una minima attività residua di LDLR, Evinacumab ha tutti i presupposti per presentarsi come valida alternativa nelle forme di completo deficit di LDLR.

Da quanto discusso sino ad ora appare chiaro come Angptl3 sia una proteina interessante e che la sua inibizione possa rappresentare un obiettivo terapeutico rivoluzionario nella cura delle dislipidemie e dell'aterosclerosi. Rimangono ancora da chiarire alcuni punti relativamente al suo funzionamento/inibizione (e.g. modalità attraverso il quale si riducono i livelli di LDL, flusso di FFA), nonché l'effettivo beneficio per la prevenzione cardiovascolare.

Innanzitutto, i dati raccolti sino ad oggi sembrerebbero indicare che vi siano delle differenze nella potenza ipolipemizzante tra Evinacumab e Vupanorsen, ma ancora non sappiamo se siano ascrivibili al tipo di strategia terapeutica utilizzata o al protocollo di trattamento.

Inoltre, nonostante i dati preliminari sui soggetti portatori di mutazioni LOF in ANGPTL3 e sull'inibizione farmacologica di ANGPTL3 abbiano mostrato un buon profilo di *safety*, dobbiamo acquisire ancora dati più robusti circa l'utilizzo nel lungo termine. Nel dettaglio di questo aspetto, la sicurezza a livello epatico dell'inibizione ANGPTL3 rimane un quesito ancora meritevole di studi approfonditi, in particolare dopo la decisione di non proseguire lo sviluppo del vupanorsen a causa di questi potenziali effetti avversi. In relazione a questo ultimo punto, abbiamo ancora bisogno di tempo e di *trial* più ampi e con *fol-*

*low-up* più estesi per valutare se questa promettente opzione farmacologica si tradurrà in un reale effetto anti-aterosclerotico. Solo uno studio mono-centro, che ha incluso due soggetti HoFH portatori di mutazioni null/null su LDLR, ha dimostrato che un'aggressiva multi-terapia, che includeva anche Evinacumab, riduceva il volume dell'ateroma coronarico in sei mesi di trattamento (valutato tramite tomografia computerizzata) (NCT03399786) (59).

Quest'ultimo esempio, ci serve anche per volgere alla conclusione di questa breve revisione, indicando come approcci di biotecnologia farmaceutica così avanzati per il trattamento di queste forme severe necessitano di diverse valutazioni critiche, anche in ambito farmaco-economico. Benché accettabile per queste forme a rischio ASCVD molto alto, il costo elevato della terapia richiede una sempre maggiore consapevolezza e caratterizzazione del quadro clinico del paziente, della sua storia familiare e, ove possibile, del quadro genetico. Questo nuovo approccio terapeutico necessita di algoritmi clinici sempre più personalizzati e più oculati che non rinneghino e, anzi, sfruttino, ove possibile, le opzioni terapeutiche esistenti. L'avvento di terapie geniche (vedasi i siRNA contro PCSK9 (60) o le proposte di *gene editing* contro ANGPTL3) aprono scenari futuristici con riduzione delle somministrazioni e, probabilmente, dei costi nel lungo termine. Tuttavia, il continuo accumulo di queste nuove opzioni, senza una visione comprensiva e critica di tutto quello di cui già disponiamo, rischia di far pagare il prezzo di inconvenienti, tra cui il ridotto beneficio assoluto di queste terapie nel tempo e la ridotta aderenza del paziente.

#### *Conflitto di interessi*

Gli autori non riportano conflitti di interesse per la stesura di questo manoscritto.

### RIASSUNTO

Angiopietina-3 (ANGPTL3) è un importante inibitore dell'attività della lipasi lipoproteica e della lipasi endoteliale, rappresentando così un regolatore cruciale del catabolismo delle lipoproteine ricche in trigliceridi a molto bassa densità (VLDL) che, in virtù del loro colesterolo residuo ("remnant"), esercitano significativi effetti pro-infiammatori e pro-aterogeni sull'endotelio vascolare.

Le evidenze precliniche (modelli murini di ANGPTL3 "knock-out") hanno dimostrato che l'assenza genetica di questo mediatore si associa a robuste riduzioni di trigliceridi plasmatici e di colesterolo LDL anche in assenza del recettore delle LDL. Questa osservazione è risultata cruciale nel considerare questo *target* per il trattamento delle forme di ipercolesterolemia familiare (FH) omozigote resistenti alle attuali terapie. Pertanto, sono stati sviluppati un anticorpo monoclonale (Evinacumab) diretto contro la forma circolante della proteina e oligonucleotidi antisenso per l'inibizione del trascritto genico (Vupanorsen). Queste due opzioni stanno fornendo convincenti risultati in termini di efficacia e di sicurezza in studi di Fase I, Fase II e Fase III (questi ultimi per Evinacumab). Molti dati sono ancora da acquisire, specialmente quelli riguardanti l'effetto anti-aterosclerotico a lungo-termine, ma vi è molta aspettativa su questo *target* per il quale, per la prima volta in ambito cardiovascolare, si è arrivati molto vicini con l'opzione di *gene editing* attraverso CRISPR-Cas9. Questa revisione vuole riassumere sia le basi molecolari sia i successi, gli aspetti critici e quelli da definire, riguardanti lo sviluppo di questa prospettiva terapeutica così promettente per le dislipidemie severe per le quali, ad oggi, manca una efficace alternativa terapeutica.

**Parole chiave:** *Angiopietina-3, Ipercolesterolemia Familiare Omozigote, Ipertrigliceridemia, anticorpi monoclonali, oligonucleotidi antisenso, CRISPR-Cas9.*

### Bibliografia

- Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. Vol. 41, European Heart Journal. Oxford University Press. 2020; 111-188.
- Sniderman AD, Thanassoulis G, Glavinovic T, Navar AM, Pencina M, Catapano A, et al. Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease: A Narrative Review. JAMA Cardiol [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Mar 27]; 4(12): 1287-1295. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31642874/>
- Björnson E, Adiels M, Taskinen MR, Borén J. Kinetics of plasma triglycerides in abdominal obesity. Curr Opin Lipidol [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 28]; 28(1): 11-18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27898581/>
- Baragetti A. La lipemia postprandiale: Dai risultati sperimentali all'intervento terapeutico. 2016 [cited 2022 Mar 27]; 24-35. Available from: [http://www.sefap.it/web/upload/GIFF2016-2\\_24\\_35.pdf](http://www.sefap.it/web/upload/GIFF2016-2_24_35.pdf)
- Klop B, Proctor SD, Mamo JC, Botham KM, Castro Cabezas M. Understanding Postprandial Inflammation and Its Relationship to Lifestyle Behaviour and Metabolic Diseases. Int J Vasc Med [Internet]. 2012 [cited 2019 Mar 22]; 2012: 1-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21961070>
- Norata GD, Grigore L, Raselli S, Redaelli L, Hamsten A, Maggi F, et al. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: Molecular mechanisms and gene expression studies. Atherosclerosis [Internet]. 2007 Aug [cited 2018 May 1]; 193 (2): 321-327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055512>
- Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. Postprandial lipemia as a cardiometabolic risk factor. Curr Med Res Opin [Internet]. 2014 Aug 2 [cited 2019 Mar 22]; 30 (8): 1489-1503. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007995.2014.909394>
- Berry SE, Valdes AM, Drew DA, Asnicar F, Mazidi M, Wolf J, et al. Human postprandial responses to food and potential for precision nutrition. Nat Med [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Sep 10]; 26 (6): 964-973. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32528151/>
- Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. Br J Nutr [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2019 Sep 3]; 98 (3): 458-473. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S000711450774268X/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S000711450774268X/type/journal_article)
- Nordestgaard BG. A Test in Context: Lipid Pro-

- file, Fasting Versus Nonfasting. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Sep 26; 70 (13): 1637-1646.
11. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting Triglycerides and Risk of Myocardial Infarction, Ischemic Heart Disease, and Death in Men and Women. *JAMA* [Internet]. 2007 Jul 18 [cited 2019 Mar 22]; 298 (3): 299. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635890>
  12. Varbo A, Nordestgaard BG. Nonfasting Triglycerides, Low-Density Lipoprotein Cholesterol, and Heart Failure Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2019 Mar 22]; 38 (2): 464-472. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097364>
  13. Thomsen M, Varbo A, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Low Nonfasting Triglycerides and Reduced All-Cause Mortality: A Mendelian Randomization Study. *Clin Chem* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2019 Mar 22]; 60 (5): 737-746. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24436475>
  14. Shulman GI. Ectopic Fat in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Cardiometabolic Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Sep 18 [cited 2022 Feb 28]; 371 (12): 1131-1141. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra1011035>
  15. Wu SA, Kersten S, Qi L. Lipoprotein Lipase and Its Regulators: An Unfolding Story. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Mar 27]; 32 (1): 48-61. Available from: <http://www.cell.com/article/S104327602030223Xfull-text>
  16. Conklin D, Gilbertson D, Taft DW, Maurer MF, Whitmore TE, Smith DL, et al. Identification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specifically in liver. *Genomics* [Internet]. 1999 Dec 15 [cited 2022 Mar 27]; 62 (3): 477-482. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10644446/>
  17. Bini S, D'Erasmo L, Di Costanzo A, Minicocci I, Pecce V, Arca M. The Interplay between Angiopoietin-Like Proteins and Adipose Tissue: Another Piece of the Relationship between Adiposity and Cardiometabolic Diseases? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jan 2 [cited 2022 Mar 27]; 22 (2): 1-16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33451033/>
  18. Kaplan R, Zhang T, Hernandez M, Xiaodong Gan F, Wright SD, Waters MG, et al. Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *J Lipid Res* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2022 Feb 28]; 44 (1): 136-143. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12518032/>
  19. Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, Kurihara S, Awata T, Katagiri H, et al. ANGPTL3 is increased in both insulin-deficient and -resistant diabetic states. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 May 14 [cited 2022 Mar 27]; 317 (4): 1075-1079. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15094378/>
  20. Shimamura M, Matsuda M, Ando Y, Koishi R, Yasumo H, et al. Leptin and insulin down-regulate angiopoietin-like protein 3, a plasma triglyceride-increasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 Sep 24 [cited 2022 Mar 27]; 322 (3): 1080-1085. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336575/>
  21. Fugier C, Tousaint JJ, Prieur X, Plateroti M, Samarut J, Delerive P. The lipoprotein lipase inhibitor ANGPTL3 is negatively regulated by thyroid hormone. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Apr 28 [cited 2022 Mar 27]; 281 (17): 11553-11559. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16505486/>
  22. Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, et al. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jan 5 [cited 2022 Mar 27]; 119 (1): 70-79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19075393/>
  23. Li Y, Sun L, Xu H, Fang Z, Yao W, et al. Angiopoietin-like protein 3 modulates barrier properties of human glomerular endothelial cells through a possible signaling pathway involving phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B and integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Mar 27]; 40 (6): 459-465. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18535744/>
  24. Dai R, Lin Y, Liu H, Rao J, Zhai Y, Zha X, et al. A vital role for Angptl3 in the PAN-induced podocyte loss by affecting detachment and apoptosis in vitro. *BMC Nephrol* [Internet]. 2015 Mar 29 [cited 2022 Mar 27]; 16 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25884163/>
  25. Lin Y, Rao J, Zha XL, Xu H. Angiopoietin-like 3 induces podocyte F-actin rearrangement through integrin  $\alpha$ (V) $\beta$ 3/FAK/PI3K pathway-mediated Rac1 activation. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013 [cited 2022 Mar 27]; 2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294595/>
  26. Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M, Hass P, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin  $\alpha$  v $\beta$  3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 May 10 [cited 2022 Mar 27]; 277 (19): 17281-17290. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11877390/>

27. Ono M, Shimizugawa T, Shimamura M, Yoshida K, Noji-Sakikawa C, Ando Y, et al. Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiotensin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Oct 24 [cited 2022 Mar 27]; 278 (43): 41804-41809. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12909640/>
28. Dongiovanni P, Meroni M, Baselli G, Mancina RM, Ruscica M, Longo M, et al. PCSK7 gene variation bridges atherogenic dyslipidemia with hepatic inflammation in NAFLD patients. *J Lipid Res* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 27]; 60 (6): 1144-1153. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30918065/>
29. Fujimoto K, Koishi R, Shimizugawa T, Ando Y. Angptl3-null mice show low plasma lipid concentrations by enhanced lipoprotein lipase activity. *Exp Anim* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2022 Mar 27]; 55 (1): 27-34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16508209/>
30. Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, Yoshida K, Ando Y, Koishi R, et al. ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Sep 13 [cited 2022 Mar 27]; 277 (37): 33742-337428. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12097324/>
31. Shimamura M, Matsuda M, Kobayashi S, Ando Y, Ono M, Koishi R, et al. Angiotensin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2003 Feb 7 [cited 2022 Mar 27]; 301 (2): 604-609. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12565906/>
32. Wang Y, McNutt MC, Banfi S, Levin MG, Holland WL, Gusarova V, et al. Hepatic ANGPTL3 regulates adipose tissue energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2022 Mar 27]; 112 (37): 11630-11635. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26305978/>
33. Wang Y, Gusarova V, Banfi S, Gromada J, Cohen JC, Hobbs HH. Inactivation of ANGPTL3 reduces hepatic VLDL-triglyceride secretion. *J Lipid Res* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Mar 27]; 56 (7): 1296-1307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25954050/>
34. Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C, et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Dec 2 [cited 2022 Mar 27]; 363 (23): 2220-2227. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20942659/>
35. Minicocci I, Santini S, Cantisani V, Stitzel N, Kathiresan S, Arroyo JA, et al. Clinical characteristics and plasma lipids in subjects with familial combined hypolipidemia: a pooled analysis. *J Lipid Res* [Internet]. 2013 Dec [cited 2022 Mar 27]; 54 (12): 3481-3490. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24058201/>
36. Minicocci I, Tikka A, Poggiogalle E, Metso J, Montali A, Ceci F, et al. Effects of angiotensin-like protein 3 deficiency on postprandial lipid and lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2022 Mar 27]; 57 (6): 1097-1107. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27040449/>
37. Stitzel NO, Khera A V., Wang X, Bierhals AJ, Vourakis AC, et al. ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2017 Apr 25 [cited 2022 Mar 27]; 69 (16): 2054-2063. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28385496/>
38. Bellosta S, Rossi C, Alieva AS, Catapano AL, Corsini A, Baragetti A. Cholesterol Lowering Biotechnological Strategies: From Monoclonal Antibodies to Antisense Therapies. A Pre-Clinical Perspective Review. *Cardiovasc drugs Ther* [Internet]. 2022 [cited 2022 Mar 27]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35022949/>
39. Dewey FE, Gusarova V, Dunbar RL, O'Dushlaine C, Schurmann C, Gottesman O, et al. Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2022 Mar 27]; 377 (3): 211-221. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28538136/>
40. Ahmad Z, Banerjee P, Hamon S, Chan KC, Bouzelmat A, Sasiela WJ, et al. Inhibition of Angiotensin-Like Protein 3 With a Monoclonal Antibody Reduces Triglycerides in Hypertriglyceridemia. *Circulation* [Internet]. 2019 Aug 6 [cited 2022 Mar 27]; 140 (6): 470-486. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31242752/>
41. Evinacumab Lowers Triglycerides in Severe Hypertriglyceridemia | tctmd.com [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://www.tctmd.com/news/evinacumab-lowers-triglycerides-severe-hypertriglyceridemia>
42. Rosenson RS, Burgess LJ, Ebenbichler CF, Baum SJ, Stroes ESG, Ali S, et al. Evinacumab in Patients with Refractory Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Dec 10 [cited 2022 Mar 27]; 383 (24): 2307-2319. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2031049>
43. Gaudet D, Gipe DA, Pordy R, Ahmad Z, Cuchel M, Shah PK, et al. ANGPTL3 Inhibition in Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jul 20 [cited 2022

- Mar 27]; 377 (3): 296-297. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM1705994>
44. Banerjee P, Chan KC, Tarabocchia M, Benito-Vicente A, Alves AC, Uribe KB, et al. Functional analysis of LDLR (low-density lipoprotein receptor) variants in patient lymphocytes to assess the effect of evinacumab in homozygous familial hypercholesterolemia patients with a spectrum of LDLR activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Mar 27]; 39 (11): 2248-2260. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/ATVBAHA.119.313051>
  45. Raal FJ, Rosenson RS, Reeskamp LF, Hovingh GK, Kastelein JJP, et al. Evinacumab for Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2022 Mar 2]; 383 (8): 711-720. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32813947/>
  46. Markham A. Evinacumab: First Approval. *Drugs* 2021 819 [Internet]. 2021 May 18 [cited 2022 Mar 27]; 81 (9): 1101-1105. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-021-01516-y>
  47. Adam RC, Mintah IJ, Alexa-Braun CA, Shihani LM, Lee JS, Banerjee P, et al. Angiopoietin-like protein 3 governs LDL-cholesterol levels through endothelial lipase-dependent VLDL clearance. *J Lipid Res.* 2020 Sep; 61 (9): 1271-1286.
  48. Wu L, Soundarapandian MM, Castoreno AB, Millar JS, Rader DJ. LDL-Cholesterol Reduction by ANGPTL3 Inhibition in Mice Is Dependent on Endothelial Lipase. *Circ Res.* 2020 Sep; 127 (8): 1112-1114.
  49. Graham MJ, Lee RG, Brandt TA, Tai L-J, Fu W, Peralta R, et al. Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N Engl J Med.* 2017 Jul; 377 (3): 222-232.
  50. Gaudet D, Karwowska-Prokopczuk E, Baum SJ, Hurh E, Kingsbury J, Bartlett VJ, et al. Vupanorsen, an N-acetyl galactosamine-conjugated antisense drug to ANGPTL3 mRNA, lowers triglycerides and atherogenic lipoproteins in patients with diabetes, hepatic steatosis, and hypertriglyceridaemia. *Eur Heart J* [Internet]. 2020 Oct 21 [cited 2022 Mar 2]; 41 (40): 3936-3945. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32860031/>
  51. Phase 2 Study of AKCEA-ANGPTL3-LRx (ISIS 703802) in Participants With Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03360747>
  52. Pfizer and Ionis Announce Discontinuation of Vupanorsen Clinical Development Program | Pfizer [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-ionis-announce-discontinuation-Vupanorsen>
  53. A Dose-Ranging Study With Vupanorsen (TRANSLATE-TIMI 70) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Mar 27]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04516291>
  54. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80-) [Internet]. 2012 Aug 17 [cited 2021 Apr 8]; 337 (6096): 816-821. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745249/>
  55. Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, Whitehead EH, La Russa M, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell* [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2021 May 10]; 160 (1-2): 339-350. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533786/>
  56. Chadwick AC, Evitt NH, Lv W, Musunuru K. Reduced blood lipid levels with in vivo CRISPR-Cas9 base editing of ANGPTL3 [Internet]. Vol. 137, *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018 [cited 2021 Apr 8]; 975-977. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29483174/>
  57. Zheng J, Huynh HD, Umikawa M, Silvany R, Zhang CC. Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood* [Internet]. 2011 Jan 13 [cited 2021 Apr 8]; 117 (2): 470-479. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20959605/>
  58. Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, et al. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med* [Internet]. 2006 Mar 14 [cited 2022 Mar 2]; 12 (2): 240-245. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16429146/>
  59. Reeskamp LF, Nurmohamed NS, Bom MJ, Planken RN, Driessen RS, van Diemen PA, et al. Marked plaque regression in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Mar 2]; 327: 13-17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34004483/>
  60. Ray KK, Landmesser U, Leiter LA, Kallend D, Dufour R, Karakas M, et al. Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N Engl J Med.* 2017; 376 (15): 1430-1440.