



(10) 授权公告号 CN 114829395 B

(45) 授权公告日 2023.12.12

(21) 申请号 202180007277.5

专利权人 上海恒瑞医药有限公司

(22) 申请日 2021.01.22

(72) 发明人 付雅媛 许迎霞 林冰 陶维康

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114829395 A

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

(43) 申请公布日 2022.07.29

专利代理师 程伟

(66) 本国优先权数据  
202010073192.4 2020.01.22 CN

(51) Int.Cl.  
C07K 16/22 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2022.06.16

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/CN2021/073239 2021.01.22

WO 2013181438 A2, 2013.12.05  
CN 103732624 A, 2014.04.16  
CN 108697797 A, 2018.10.23  
CN 101855241 A, 2010.10.06

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02021/147984 ZH 2021.07.29

审查员 吕小蒙

(73) 专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司  
地址 222047 江苏省连云港市经济技术开  
发区昆仑山路7号

权利要求书2页 说明书29页 附图4页

(54) 发明名称

抗ANGPTL3抗体及其应用

(57) 摘要

涉及抗ANGPTL3抗体及其应用。具体地,涉及一种抗ANGPTL3抗体及其抗原结合片段,或其可药用盐或溶剂化合物,以及其作为药物的用途,尤其在制备用于治疗高脂血症的药物中的用途。

1. 一种抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含抗体重链可变区和轻链可变区,其中:

i) 所述重链可变区与如SEQ ID NO:13序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区与如SEQ ID NO:14序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

ii) 所述重链可变区与如SEQ ID NO:11序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区与如SEQ ID NO:12序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或者

iii) 所述重链可变区与如SEQ ID NO:9序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区与如SEQ ID NO:10序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

iv) 所述重链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:26所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

v) 所述重链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或者

vi) 所述重链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

3. 根据权利要求1或2所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

(A) 所述重链可变区与SEQ ID NO:13具有至少90%序列同一性,和/或所述轻链可变区与SEQ ID NO:14具有至少90%序列同一性;

(B) 所述重链可变区与SEQ ID NO:11具有至少90%序列同一性,和/或所述轻链可变区与SEQ ID NO:12具有至少90%序列同一性;或者

(C) 所述重链可变区与SEQ ID NO:9具有至少90%序列同一性,和/或所述轻链可变区与SEQ ID NO:10具有至少90%序列同一性。

4. 根据权利要求3所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

(D) 序列如SEQ ID NO:13所示的重链可变区,和序列如SEQ ID NO:14所示的轻链可变区;

(E) 序列如SEQ ID NO:11所示的重链可变区,和序列如SEQ ID NO:12所示的轻链可变区;或者

(F) 序列如SEQ ID NO:9所示的重链可变区,和序列如SEQ ID NO:10所示的轻链可变区。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗

ANGPTL3抗体进一步包含重链恒定区和轻链恒定区。

6. 根据权利要求5所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4恒定区,所述轻链恒定区选自人 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链恒定区。

7. 根据权利要求6所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区,其序列如SEQ ID NO:29所示或与SEQ ID NO:29具有至少85%序列同一性,和/或所述轻链恒定区,其序列如SEQ ID NO:30所示或与SEQ ID NO:30具有至少85%序列同一性。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗ANGPTL3抗体包含重链和轻链,其中,

(G) 所述重链与SEQ ID NO:35具有至少85%序列同一性,和/或所述轻链与SEQ ID NO:36具有至少85%序列同一性;

(H) 所述重链与SEQ ID NO:33具有至少85%序列同一性,和/或所述轻链与SEQ ID NO:34具有至少85%序列同一性;或

(I) 所述重链与SEQ ID NO:31具有至少85%序列同一性,和/或所述轻链与SEQ ID NO:32具有至少85%序列同一性。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗ANGPTL3抗体包含重链和轻链,其中,

(J) 所述重链如SEQ ID NO:35所示,和所述轻链如SEQ ID NO:36所示;

(K) 所述重链如SEQ ID NO:33所示,和所述轻链如SEQ ID NO:34所示;或

(L) 所述重链如SEQ ID NO:31所示,和所述轻链如SEQ ID NO:32所示。

10. 一种核酸分子,其编码权利要求1至9中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。

11. 一种宿主细胞,其包含如权利要求10所述的核酸分子。

12. 一种药物组合物,其含有:

(A) 治疗有效量的根据权利要求1至9中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或根据权利要求10所述的核酸分子,以及

(B) 一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

13. 一种用于免疫检测或测定ANGPTL3的方法,所述方法包括使用权利要求1至9中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段的步骤,所述方法用于非疾病诊断目的。

14. 一种试剂盒,其包含根据权利要求1至9中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。

15. 如权利要求1至9中任一项所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段或权利要求10所述的核酸分子或权利要求12所述的药物组合物在制备治疗疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症为高胆固醇血症、高脂血症或动脉粥样硬化疾病。

## 抗ANGPTL3抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本披露涉及抗体药物领域。具体地包括抗ANGPTL3抗体药物以及其应用。

### 背景技术

[0002] 这里的陈述仅提供与本发明有关的背景信息,而不必然地构成现有技术。

[0003] 血管生成素样蛋白3 (ANGPTL3、ANGPTL-3) 基因是Conklin等人基于信号序列和两亲性螺旋结构从EST数据库鉴定出的新基因,其从人胚胎肝/脾cDNA文库分离出人ANGPTL3的全长cDNA (Conklin et al.,1999,Genomics62:477-482)。由460个氨基酸组成的人ANGPTL3蛋白 (hANGPTL3) 与小鼠ANGPTL3蛋白具有76%氨基酸序列同一性,并具有血管生成素的特征结构,包括一个信号肽、一个预期将形成二聚或三聚卷曲螺旋的伸展的螺旋结构域、一个短连接肽,以及一个球状纤维蛋白原同源结构域 (FD) (Conklin et al.,1999,Genomics62:477-482)。ANGPTL3不同于血管生成素 (ANGs),ANGPTL3不与Tie2结合,但是,通过它的C-端FD与整联蛋白 $\alpha v\beta 3$ 结合,它也可诱导血管生成 (Camenisch et al.,2002,J Biol Chem277:17281-17290)。

[0004] 另外,ANGPTL3是影响脂肪代谢的一个重要的因子,ANGPTL3可以抑制LPL的活性,从而降低甘油三酯、低密度脂蛋白的清除率,而高甘油三酯血症参与了一系列代谢性疾病的发病过程。血浆甘油三酯水平升高可通过诱导血小板聚集和血浆纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-1) 的产生,以及增加泡沫细胞的数量和促进血管平滑肌细胞的增殖和迁移,从而参与动脉粥样硬化的病理过程。抗ANGPTL3抗体可以与ANGPTL3特异性结合,从而抑制或干扰ANGPTL3活性,进而治疗动脉粥样硬化以及高脂血症等疾病。目前,W02012174178A1、W02008073300A2、CN107085112A等专利文献中公开多种抗ANGPTL3抗体。

### 发明内容

[0005] 本披露提供一种抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,本披露提供一种抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含抗体重链可变区和轻链可变区,其中:

[0006] i) 所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:9序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:10序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0007] ii) 所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:11序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:12序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或者

[0008] iii) 所述重链可变区包含与如SEQ ID NO:13序列所示的重链可变区具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含与如SEQ ID NO:14序列所示的轻链可变区具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

[0009] 在一些实施方案中,如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0010] iv) 所述重链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0011] v) 所述重链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3;或者

[0012] vi) 所述重链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:26所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含序列分别如SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些实施方案中,如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0013] (A) 所述重链可变区与SEQ ID NO:9序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,和/或所述轻链可变区与SEQ ID NO:10序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性;

[0014] (B) 所述重链可变区与SEQ ID NO:11序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,和/或所述轻链可变区与SEQ ID NO:12序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性;或者

[0015] (C) 所述重链可变区与SEQ ID NO:13序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,和/或所述轻链可变区与SEQ ID NO:14序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0016] 在一些实施方案中,如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其包含如下所示的重链可变区和轻链可变区:

[0017] (D) 所述重链可变区序列如SEQ ID NO:9所示,和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:10所示;

[0018] (E) 所述重链可变区序列如SEQ ID NO:11所示,和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:12所示;或者

[0019] (F) 所述重链可变区序列如SEQ ID NO:13所示,和所述轻链可变区序列如SEQ ID NO:14所示。

[0020] 在一些实施方案中,如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述抗ANGPTL3抗体进一步包含重链恒定区和轻链恒定区;在一些实施方案中,所述重链恒定区选自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4恒定区,所述轻链恒定区选自人 $\kappa$ 和 $\lambda$ 链恒定区;在一些实施方案中,所述重链恒定区序列如SEQ ID NO:29所示或与SEQ ID NO:29序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性,和/或所述轻链恒定区序列如SEQ ID NO:30所示或与SEQ ID NO:30序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性。在一些实施方案中,如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述的抗ANGPTL3抗体包含重链和轻链,其中,

[0021] (G) 所述重链与SEQ ID NO:31序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性,和/或所述轻链与SEQ ID NO:32序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、或99%同一性；

[0022] (H) 所述重链与SEQ ID NO:33序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性,和/或所述轻链与SEQ ID NO:34序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性;或

[0023] (I) 所述重链与SEQ ID NO:35序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性,和/或所述轻链与SEQ ID NO:36序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%同一性。

[0024] 在一些实施方案中,如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,其中所述的抗ANGPTL3抗体包含重链和轻链,其中,

[0025] (J) 所述重链序列如SEQ ID NO:31所示,和轻链序列如SEQ ID NO:32所示;

[0026] (K) 所述重链序列如SEQ ID NO:33所示,和轻链序列如SEQ ID NO:34所示;或

[0027] (L) 所述重链序列如SEQ ID NO:35所示,和轻链序列如SEQ ID NO:36所示。

[0028] 在一些实施方案中,本披露提供一种分离的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,所述抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段与前述抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段竞争性结合ANGPTL3抗原。在一些实施方案中,所述ANGPTL3抗原为人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、猴ANGPTL3、大鼠ANGPTL3。

[0029] 在一些实施方案中,本披露所述的抗体是人抗体或人源抗体。在一些实施方案中,本披露所述的抗原结合片段选自:Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fd、Fv、dsFv、scFv、Fab和双抗体。在一些实施方案中,本披露抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段具有以下a-d特征中的至少一种:

[0030] a. 与ANGPTL3蛋白特异性结合。在一些实施方案中,所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段以小于10nM(例如小于或等于5nM、小于或等于3nM、小于或等于1nM、小于或等于0.8nM、小于或等于0.6nM、小于或等于0.4nM、小于或等于0.3nM、小于或等于0.2nM)的EC<sub>50</sub>与人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、食蟹猴ANGPTL3和/或大鼠ANGPTL3结合;在一些实施方案中,所述的EC<sub>50</sub>是通过ELISA方法测定,例如本披露的测试例1所述;在一些实施方案中,所述的EC<sub>50</sub>是通过HTRF方法测定,例如本披露的测试例2所述;

[0031] b. 以高亲和力结合ANGPTL3蛋白。在一些实施方案中,所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段以小于10E-10M(例如小于或等于9E-10M、小于或等于8E-10M、小于或等于7E-10M、小于或等于6E-10M、小于或等于3E-10M、小于或等于2E-10M、小于或等于1E-10M、小于或等于8E-11M、小于或等于6E-11M、小于或等于5E-11M)的KD值与人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、食蟹猴ANGPTL3和/或大鼠ANGPTL3抗原结合;在一些实施方案中,所述KD值是通过Biacore方法测定的,例如本披露的测试例4所述;

[0032] c. 阻断ANGPTL3对LPL酶的抑制作用。在一些实施方案中,所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段以小于170nM(例如小于或等于80nM、小于或等于135nM、小于或等于80nM、小于或等于55nM)的IC<sub>50</sub>值阻断人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、食蟹猴ANGPTL3和/或大鼠ANGPTL3对LPL酶活性的抑制。所述IC<sub>50</sub>可通过酶活实验测定,例如本披露的测试例3所述;和/或

[0033] d. 具有良好降脂效果。在一些实施方案中,本披露的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段的降脂效果如测试例5、6和/或7所示。在一些实施方案中,本披露提供一种核酸分子,其编码前述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。

[0034] 在一些实施方案中,本披露提供一种载体,其包含前述的核酸分子。

[0035] 在一些实施方案中,本披露提供一种宿主细胞,其包含前述的核酸分子。在一些实施方案中,本披露提供一种宿主细胞,其由前述的载体转化(或转导、转染)获得;所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞,优选为真核细胞,更优选哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞不包括任何能够发育成完整个体的人细胞,如人胚胎干细胞、受精卵、生殖细胞;在一些实施方案中,所述宿主细胞为真核细胞,更优选哺乳动物细胞,其中所述的哺乳动物细胞包括但不限于CHO、293、NS0,以及在哺乳动物细胞中进行基因编辑可改变抗体或其抗原结合片段的糖基化修饰,进而改变抗体或其抗原结合片段的ADCC功能的细胞,例如,敲除FUT8或GnT-III等基因;在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞不包括人细胞。

[0036] 在一些实施方案中,本披露提供一种药物组合物,其含有治疗有效量的前述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或前述的核酸分子,以及一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。在一些实施方案中,所述药物组合物单位剂量中含有0.01至99重量%的前述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或前述的核酸分子。在一些实施方案中,所述药物组合物单位剂量中含有0.1-2000mg,更优选为1-1000mg的前述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或前述的核酸分子。

[0037] 在一些实施方案中,本披露提供一种用于免疫检测或测定ANGPTL3的方法,所述方法包括前述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。在另一方面,本披露提供一种体外检测受试者样品中ANGPTL3表达水平的方法,所述方法包括使本披露中所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段与所述样品接触的步骤;在一些实施方案中,所述样品为来自受试者的血浆、血清、全血样品。在一些实施方案中,可以使用本领域技术人员公知的任何方法检测ANGPTL3的表达水平,这样的方法包括但不限于:Western blot、免疫印迹、ELISA、质谱法。

[0038] 在一些实施方案中,本披露提供一种试剂盒,其包含前述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。

[0039] 在一些实施方案中,本披露提供一种如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段的制备方法。

[0040] 在一些实施方案中,本披露提供如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段在制备免疫检测ANGPTL3的试剂中的用途。

[0041] 在一些实施方案中,本披露提供一种用于免疫检测或测定ANGPTL3的如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段;

[0042] 在一些实施方案中,本披露提供一种试剂盒,其包含根据如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,本披露提供一种用于检测ANGPTL3表达水平的试剂盒,其包含根据如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述试剂盒用于本披露所述的ANGPTL3表达水平的检测方法中;在一些实施方案中,所述检测方法为本领域技术人员公知的任何方法,包括但不限于,Western blot、免疫印迹、ELISA、质谱法。

[0043] 在一些实施方案中,本披露提供一种治疗疾病或病症的方法,所述方法包括向受

试者施用治疗有效量的如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或核酸分子,或药物组合物;在一些实施方案中,所述疾病或病症为ANGPTL3相关的疾病或病症;在一些实施方案中,所述疾病或病症为高胆固醇血症、高脂血症或动脉粥样硬化疾病。

[0044] 在一些实施方案中,本披露提供如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或核酸分子,或药物组合物在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。在一些实施方案中,所述疾病或病症为ANGPTL3相关的疾病或病症;在一些实施方案中,所述疾病或病症为高胆固醇血症、高脂血症或动脉粥样硬化疾病。

[0045] 在一些实施方案中,本披露提供作为药物的如前所述的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,或核酸分子,或药物组合物。在一些实施方案中,所述药物用于治疗ANGPTL3相关的疾病或病症;在一些实施方案中,所述疾病或病症为高胆固醇血症、高脂血症或动脉粥样硬化疾病。

[0046] 发明详述

[0047] 术语(定义)

[0048] 为了更容易理解本披露,以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义,本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0049] 本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J. biol. chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

[0050] 本披露所述的“抗体”指免疫球蛋白,天然完整抗体是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。根据免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE,其相应的重链分别为 $\mu$ 链、 $\delta$ 链、 $\gamma$ 链、 $\alpha$ 链、和 $\epsilon$ 链。同一类Ig根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如IgG可分为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。五类Ig中每类Ig都可以有 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。

[0051] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(Fv区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由3个CDR区4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2、和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0052] 本披露“抗体”除包括全长抗体外,还包括能结合抗原的抗原结合片段。

[0053] 本披露的抗体包括人抗体。

[0054] 术语“鼠源抗体”在本披露中为根据本领域知识和技能制备的针对人ANGPTL3的单克隆抗体。制备时可用ANGPTL3抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本披露一个优选的实施方案中,所述的鼠源抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段,可进一步包含鼠源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或其变体的重链恒定区。

[0055] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将异源(例如鼠源)性抗体的可变区与



亲本抗体(例如人抗体)的恒定区融合而成的抗体,可以减轻异源性抗体诱发的免疫应答反应。例如,人鼠嵌合抗体,建立嵌合抗体,要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤,然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中,最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本披露一个优选的实施方法中,所述的抗ANGPTL3嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体的轻链恒定区。所述的ANGPTL3嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体的重链恒定区,优选包含人源IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区,或者使用氨基酸突变(例如L234A和/或L235A突变,和/或S228P突变)的IgG1、IgG2或IgG4变体。

[0056] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分,从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库获得,以及在Kabat,E.A.等人,1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版中找到。为避免免疫原性下降的同时,引起的活性下降,可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变,以保持活性。本披露的人源化抗体也包括进一步由酵母菌展示对CDR进行亲和力成熟突变后的人源化抗体。

[0057] 术语“人抗体”与“人源抗体”可以互换使用,是指有一或多个可变区和恒定区来源于人免疫球蛋白序列。其中一个优选的方式是所有的可变区和恒定区均来自于人免疫球蛋白序列,即“完全人源抗体”或“全人抗体”。这些抗体可以通过多种方式制备获得,包括通过噬菌体展示技术,从人PBMC、脾脏、淋巴结组织分离B细胞,构建天然单链噬菌体人抗体库,或者通过免疫可表达人抗体轻重链的转基因小鼠,筛选获得的抗体。本披露的人抗体还包括在人抗体基础上经过一个或更多个氨基酸的突变获得的仍结合目标抗原的抗体。

[0058] 本披露中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体,示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重链恒定区变体,具体替换如现有技术已知的YTE突变,L234A和/或L235A突变,S228P突变,和/或获得knob-into-hole结构的突变(使得抗体重链具有knob-Fc和hole-Fc组合),这些突变已被证实使得抗体具有新的性能,但不改变抗体可变区的功能。

[0059] 术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指基本上完整形式的抗体,与下文定义的抗原结合片段相区分。该术语特别指轻链和重链包含恒定区的抗体。本披露“抗体”包含“全长抗体”及其抗原结合片段。

[0060] 在一些实施方法中,本披露的全长抗体包括由轻链可变区与轻链恒定区连接和重链可变区与重链恒定区连接后所形成的全长抗体。本领域技术人员可以根据实际需要选择不同的抗体来源的轻链恒定区、重链恒定区,例如人抗体来源的轻链恒定区和重链恒定区。

[0061] 术语“抗原结合片段”或“功能片段”是指抗体的保持特异性结合抗原(例如,ANGPTL3)的能力的一个或更多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来实现抗体的抗原结合功能。术语“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1

结构域组成的单价片段；(ii)  $F(ab')_2$  片段，包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段，(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv) 由抗体的单臂的VH和VL结构域组成的Fv片段；(v) dsFv，由VH和VL经链间二硫键形成的稳定的抗原结合片段；(vi) 包含scFv、dsFv、Fab等片段的双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。此外，虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码，但可使用重组方法，通过合成的接头连接它们，从而使其能够产生为其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白质链(称为单链Fv(scFv)；参见，例如，Bird等人(1988) *Science* 242:423-426；和Huston等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883)。此类单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组DNA技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0062] Fab可通过用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割H链的224位的氨基酸残基)处理IgG抗体分子所获得具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

[0063]  $F(ab')_2$  可通过用酶胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得分子量为约100,000并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

[0064]  $Fab'$  可通过切割上述 $F(ab')_2$ 的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。本披露的 $Fab'$ 可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理本披露的特异性识别ANGPTL3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的 $F(ab')_2$ 来生产。

[0065] 此外，可以通过将编码抗体的 $Fab'$ 片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 $Fab'$ 来生产所述 $Fab'$ 。

[0066] 术语“单链抗体”、“单链Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域(或区域；VH)和抗体轻链可变结构域(或区域；VL)的分子。此类scFv分子可具有一般结构： $NH_2$ -VL-接头-VH-COOH或 $NH_2$ -VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成，例如使用1-4个重复的变体(Holliger等人(1993)，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448)。可用于本披露的其他接头由Alfthan等人(1995)，*Protein Eng.* 8:725-731, Choi等人(2001)，*Eur. J. Immuno* 1.31:94-106, Hu等人(1996)，*Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov等人(1999)，*J. Mol. Biol.* 293:41-56和Roovers等人(2001)，*Cancer Immunol.* 描述。

[0067] 双抗体是其中scFv或Fab被二聚体化的抗体片段，是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中，两个抗原可以是相同或不同的。

[0068] 双特异性抗体和多特异性抗体是指能同时结合两个或多个抗原或抗原决定簇的抗体，其中包含能结合ANGPTL3的scFv或Fab片段。

[0069] 本披露的双抗体可以通过以下步骤来生产：获得本披露的特异性识别ANGPTL3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA，构建编码scFv的DNA以使肽接头的氨基酸序列长度为8个残基或更少，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双抗体。

[0070] dsFv是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法(Protein Engineering,7,697(1994))基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

[0071] 本披露的全长抗体或抗原结合片段可以通过以下步骤来生产:获得本披露的特异性识别人ANGPTL3并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的抗体的编码cDNA,构建编码dsFv的DNA,将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中,然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达dsFv。

[0072] 术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽,变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变,包括在原蛋白质或多肽的基础上发生1个、2个、3个或更多个氨基酸的插入、缺失或替换。

[0073] 术语“抗体框架”或“FR区”,是指可变结构域VL或VH的一部分,其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲,其是不具有CDR的可变结构域。

[0074] 术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的6个高变区之一。通常,每个重链可变区中存在三个CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),每个轻链可变区中存在三个CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定CDR的氨基酸序列边界,包括“Kabat”编号规则(参见Kabat等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)、“Chothia”编号规则(参见Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273:927-948)和ImMunoGenTics(IMGt)编号规则(Lefranc M.P., Immunologist,7,132-136(1999);Lefranc,M.P.等,Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(2003)等。

[0075] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如,ANGPTL3分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个连续或非连续的氨基酸。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed.(1996)。

[0076] 术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”、“能够特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常,抗体以大约小于 $10^{-8}$ M,例如大约小于 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、 $10^{-12}$ M或更小的亲和力(KD)结合。

[0077] 术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常,本披露的抗体以小于大约 $10^{-7}$ M,例如小于大约 $10^{-8}$ M或 $10^{-9}$ M的解离平衡常数(KD)结合ANGPTL3,例如,在本披露中抗体与细胞表面抗原的亲和力采用FACS法测定KD值;在另一些实施方案中,抗体与抗原的亲和力KD值采用Biacore法测定;在另一些实施方案中,抗体与抗原的结合采用ELISA法测定。

[0078] 当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时,意指在抗原结合蛋白之间竞争,其通过以下测定法来测定:在所述测定法中,待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其免疫学功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如ANGPTL3抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争,这些测

定例如：固相直接或间接放射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定 (EIA)、夹心竞争测定 (参见例如Stahli等,1983,Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA (参见例如Kirkland等,1986,J. Immunol.137:3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定 (参见例如Harlow和Lane,1988,Antibodies, A Laboratory Manual (抗体,实验室手册),Cold Spring Harbor Press);用I-125标记物的固相直接标记RIA (参见例如Morel等,1988,Molec. Immunol.25:7-15);固相直接生物素-亲和素EIA (参见例如Cheung,等,1990,Virology176:546-552);和直接标记的RIA (Moldenhauer等,1990,Scand.J. Immunol.32:77-82)。通常所述测定法涉及使用结合荷有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定 (竞争抗原结合蛋白) 鉴定的抗原结合蛋白包括：结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白；和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将抑制 (例如降低) 至少40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下，结合被抑制至少80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或97%或更多。

[0079] 本文中使用的术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选是双链DNA或单链mRNA或修饰的mRNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0080] 氨基酸序列“同一性”指在比对氨基酸序列及必要时引入间隙，以达成最大序列同一性百分比，且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分，第一序列中与第二序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的，比对可以通过本领域公知的多种方式来实现，例如使用公开可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或MegaAlign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

[0081] 术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中，载体是“质粒”，其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。在另一个实施方案中，载体是病毒载体，其中可将另外的DNA区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制 (例如，具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体) 或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，从而随宿主基因组一起复制 (例如，非附加型哺乳动物载体)。

[0082] 现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8章和15章。例如，鼠可以用人ANGPTL3或其片段免疫，所得到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或更多个人源FR区。人FR种系序列可以通过比对IMGT人类抗体可变区种系基因数据库和MOE软件，从ImMunoGeneTics (IMGT) 的网站得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN012441351上获得。

[0083] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科 (enterobacteriaceae) 的成员,例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株;芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*);肺炎球菌 (*Pneumococcus*);链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括CHO (中国仓鼠卵巢细胞系)、293细胞和NS0细胞。

[0084] 本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,编码重链和轻链的cDNA序列,可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在Fc区的高度保守N端位点。通过表达与人ANGPTL3特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如,用含调整过的缓冲液的A或G Sepharose FF柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用pH梯度法洗脱结合的抗体,用SDS-PAGE检测抗体片段,收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

[0085] “施用”、“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0086] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,例如包含本披露的任一种结合化合物的组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床右测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

[0087] “保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等)的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸,使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓,一般而言,多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性(参见例如Watson等(1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第224页, (第4版))。另外,结构或功能类似的

氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代于下表“示例性氨基酸保守取代”中陈述。

[0088] 表1. 示例性氨基酸保守取代

| 原始残基    | 保守取代          |
|---------|---------------|
| Ala (A) | Gly; Ser      |
| Arg (R) | Lys; His      |
| Asn (N) | Gln; His; Asp |
| Asp (D) | Glu; Asn      |
| Cys (C) | Ser; Ala; Val |
| Gln (Q) | Asn; Glu      |
| Glu (E) | Asp; Gln      |
| Gly (G) | Ala           |
| His (H) | Asn; Gln      |
| Ile (I) | Leu; Val      |
| Leu (L) | Ile; Val      |
| Lys (K) | Arg; His      |
| Met (M) | Leu; Ile; Tyr |
| Phe (F) | Tyr; Met; Leu |
| Pro (P) | Ala           |
| Ser (S) | Thr           |
| Thr (T) | Ser           |
| Trp (W) | Tyr; Phe      |
| Tyr (Y) | Trp; Phe      |
| Val (V) | Ile; Leu      |

[0090] “有效量”或“有效剂量”指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途,有益的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作,包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用,有益的结果包括临床结果,诸如减少各种本披露靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或多个症状,减少治疗病症所需的其它药剂的剂量,增强另一种药剂的疗效,和/或延缓患者的本披露靶抗原相关病症的进展。

[0091] “外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

[0092] 本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这类名称都包括后代。因此,单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移数目。还应当理解的是,由于故意或非有意的突变,所有后代在DNA含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下,其由上下文清楚可见。

[0093] 本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA和/

或DNA如在例如美国专利号4,683,195中所述扩增的程序或技术。一般来说,需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息,使得可以设计寡核苷酸引物;这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2个引物的5'末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR可用于扩增特定的RNA序列、来自总基因组DNA的特定DNA序列和由总细胞RNA转录的cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见Mullis等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich编辑,(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的PCR被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例,但不是唯一的实例,所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶,以扩增或产生核酸的特定部分。

[0094] “分离的”指纯化状态,并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子,例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料,例如细胞碎片和生长培养基。通常,术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐,除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

[0095] “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

[0096] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0097] 术语“药学上可接受的载体”指适合用于制剂中用于递送抗体或抗原结合片段的任何无活性物质。载体可以是抗粘附剂、粘合剂、包衣、崩解剂、充填剂或稀释剂、防腐剂(如抗氧化剂、抗菌剂或抗真菌剂)、增甜剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。合适的药学上可接受的载体的示例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)右旋糖、植物油(例如橄榄油)、盐水、缓冲液、缓冲的盐水和等渗剂例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

[0098] 此外,本披露包括用于治疗与目标抗原(例如ANGPTL3)阳性细胞相关的疾病的药剂,所述药剂包含本披露的抗ANGPTL3抗体或其抗原结合片段作为活性成分。

[0099] 本披露中与ANGPTL3相关的疾病没有限制,只要它是与ANGPTL3相关的疾病即可,例如利用本披露的分子诱导的治疗反应可通过结合人类ANGPTL3,然后阻遏ANGPTL3与其配体的结合。因此,当处于适于治疗应用的制备物和制剂中时,本披露的分子对这样一些人是非常有用的,他们患有高胆固醇血症、高脂血症或动脉粥样硬化疾病等。

[0100] 此外,本披露涉及用于免疫检测或测定目标抗原(例如ANGPTL3)的方法、用于免疫检测或测定目标抗原(例如ANGPTL3)的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原(例如ANGPTL3)的细胞的方法和用于诊断与目标抗原(例如ANGPTL3)阳性细胞相关的疾病的诊断剂,其包含本披露的特异性识别目标抗原(例如人ANGPTL3)并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的抗体或抗体片段作为活性成分。

[0101] 在本披露中,用于检测或测定目标抗原(例如ANGPTL3)的量的方法可以是任何已知方法。例如,它包括免疫检测或测定方法。

[0102] 免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法(RIA)、酶免疫测定法

(EIA或ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

[0103] 上述与ANGPTL3阳性细胞相关的疾病可以通过用本披露的抗体或抗体片段检测或测定表达ANGPTL3的细胞来诊断。

[0104] 为了检测表达多肽的细胞,可以使用已知的免疫检测方法,并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外,可以使用利用FMAT8100HTS系统(Applied Biosystem)的荧光抗体染色法等。

[0105] 在本披露中,对用于检测或测定目标抗原(例如ANGPTL3)的活体样品没有特别限制,只要它具有包含表达目标抗原(例如ANGPTL3)的细胞的可能性即可,例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

[0106] 根据所需的诊断方法,含有本披露的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂,例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

[0107] 在以上说明书中提出了本发明一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本发明,但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书,本发明的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中,除非上下文中有清楚的另外指明,单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语都具有本发明所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本发明的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本发明的范围,本发明的范围由权利要求书限定。

## 附图说明

[0108] 图1:P8BG抗体对SD(Sprague Dawley,斯泼累格·多雷)大鼠血清甘油三酯的影响;

[0109] 图2:P3G抗体对SD大鼠血清甘油三酯的影响;

[0110] 图3:抗ANGPTL3抗体对HFD(High-fat-diet,高脂饮食)小鼠血浆甘油三酯的影响;

[0111] 图4:抗ANGPTL3抗体对HFD小鼠血浆低密度脂蛋白胆固醇(Low-Density Lipoprotein Cholesterol,LDL-C)的影响;

[0112] 图5:抗ANGPTL3抗体对HFD小鼠血浆总胆固醇的影响;

[0113] 图6:抗ANGPTL3抗体对APOE小鼠(载脂蛋白E(apolipoprotein E,ApoE)基因敲除小鼠)血浆甘油三酯的影响;

[0114] 图7:抗ANGPTL3抗体对APOE小鼠血浆高密度脂蛋白胆固醇(High density lipotein cholesterol,HDL-C)的影响;

[0115] 图8:抗ANGPTL3抗体在小鼠体内药代动力学实验结果;

[0116] 图9:抗ANGPTL3抗体在食蟹猴体内的药代动力学实验结果。



## 具体实施方式

[0117] 以下结合实施例用于进一步描述本披露,但这些实施例并非限制本披露的范围。

[0118] 本披露实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见Sambrook等,分子克隆,实验室手册,冷泉港实验室;当代分子生物学方法,Ausubel等著,Greene出版协会,Wiley Interscience,NY。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0119] 实施例

[0120] 实施例1、ANGPTL3抗原设计及表达

[0121] 以人ANGPTL3蛋白(Uniprot号:Q9Y5C1)、小鼠ANGPTL3蛋白(Uniprot号:Q9R182)、食蟹猴ANGPTL3蛋白(Uniprot号:A0A2K5UDC5)、大鼠ANGPTL3蛋白(Uniprot号:F7FHP0)作为本披露ANGPTL3的模板,设计本披露涉及的抗原及检测用蛋白,在ANGPTL3蛋白基础上融合不同的标签,分别克隆到pTT5载体上(Biovector,Cat#:102762),在293细胞中瞬时转染表达、然后纯化,获得编码本披露抗原及检测用蛋白。

[0122] 1、人全长ANGPTL3:人-ANGPTL3(17-460)-His,可用于免疫和检测,其氨基酸序列如下:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANG  
**LLQLGHGLKDFVHKTGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELR**  
**RTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ**  
**NQPETPEHPEVTSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIE**  
**NQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNR**  
**GEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENY**  
**KYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLG**  
**NHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGG**  
**WWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTK**  
**MLIHPTDSESEFHHHHHHHHHH**

SEQ ID NO: 1

[0124] 注释:单下划线部分为信号肽序列,斜体字部分为His序列,粗体字部分为人ANGPTL3全长蛋白的第17至第460位氨基酸。

[0125] 2、人ANGPTL3胞外区:人ANGPTL3(17-170)-Flag-His,可用于免疫和检测,其氨基酸序列如下:

[0126] MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDVKILANG  
**LLQLGHGLKDFVHKTGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELR**  
**RTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ**  
**NQPETPEHPEVTSLKTFVEK***GSSDYKDDDDKHHHHHH*

SEQ ID NO: 2

[0128] 注释:单下划线部分为信号肽,双下划线部分为连接肽,斜体部分为Flag和His,粗体字部分为人ANGPTL3全长蛋白的第17至第170位氨基酸。

[0129] 3、人ANGPTL3胞外区(人ANGPTL3(17-170))与小鼠IgG2aFc段(缩写:mFc)的融合蛋

白:人ANGPTL3(17-170) -mFc,可用于检测,其氨基酸序列如下:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSL**SPEPKSRFAMLDDVKILANG**  
**LLQLGHGLKDFVHKT****KGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELR**  
**RTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLL****EKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ**  
**NQPETPEHPEV****TSLKTFVEKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK**  
 [0130] *DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN**NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV**VSA*  
*LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL**PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP**PPEEEMTK*  
*KQVTLTCMVTD**FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK*  
*NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*

SEQ ID NO: 3

[0131] 注释:下划线部分为信号肽,斜体部分为小鼠IgG2aFc,粗体字部分为人ANGPTL3全长蛋白的第17至第170位氨基酸。

[0132] 4、人ANGPTL3胞外区(人ANGPTL3(17-220))与小鼠IgG2aFc段的融合蛋白:人ANGPTL3(17-220) -mFc,用于免疫和检测,其氨基酸序列如下:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSL**SPEPKSRFAMLDDVKILANG**  
**LLQLGHGLKDFVHKT****KGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELR**  
**RTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLL****EKILLQQKVKYLEEQLTNLIQ**  
**NQPETPEHPEV****TSLKTFVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIE**  
 [0133] *LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN**NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV**VVSALP*  
*IQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL**PAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP**PPEEEMTKKQ*  
*VTLTCMVTD**FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK**NW*  
*VERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*

SEQ ID NO: 4

[0134] 注释:下划线部分为信号肽,斜体部分为小鼠IgG2aFc,粗体字部分为人ANGPTL3全长蛋白的第17至第220位氨基酸。

[0135] 5、小鼠全长ANGPTL3:小鼠ANGPTL3(17-455) -His,用于免疫和检测,其氨基酸序列如下:

**MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLS~~SS~~FDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANG  
 LLQLGHGLKDFVHKT**KGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKEL**  
 RRTTSTLQVKNEEVKNMSVELNSKLESLL**E**EKTALQHKVRALEEQLTNLI  
 LSPAGAEHPEVTSLK**SFVEQQDNSIRELLQSV**EEQYKQLSQQHM**QI**KEI  
 EKQLRKTGIQEPS**ENSLSSKSRAPRTTP**PLQLNETENTE**Q**DDL**P**ADCSAVY  
 [0136] NRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWTLIQHRKDG**SQDF**NETW  
 ENYEKGFGR**LDGEFWL**GLEKIYAIVQQSNYILRLELQDWKDSKH**Y**VEYS  
 FHLGS**HETNYTLHVAE**IAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHRAKGQLYCPESY  
 SGGWWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRKLYAIKSS  
 K**MMLQPTTHHHHHHHHHH****

SEQ ID NO: 5

[0137] 注释:下划线部分为信号肽,斜体部分为His序列,粗体字部分为小鼠ANGPTL3全长蛋白的第17至第455位氨基酸。

[0138] 6、小鼠ANGPTL3胞外区(mouse-ANGPTL3(17-220))与小鼠IgG2aFc段的融合蛋白:小鼠ANGPTL3(17-220)-mFc,用于免疫,其氨基酸序列如下:

**MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLS~~SS~~FDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANG  
 LLQLGHGLKDFVHKT**KGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKEL**  
 RRTTSTLQVKNEEVKNMSVELNSKLESLL**E**EKTALQHKVRALEEQLTNLI  
 LSPAGAEHPEVTSLK**SFVEQQDNSIRELLQSV**EEQYKQLSQQHM**QI**KEI  
 EKQLRKTGIQEPS**ENSLSSKSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK**  
 [0139] *DVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV**V**SA*  
*LPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL**P**APIERTISKPKGSVRAPQVYV**L**PPPEEMTK*  
*KQVTLTCMVTD**F**MPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK*  
*NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK***

SEQ ID NO: 6

[0140] 注释:下划线部分为信号肽,斜体部分为小鼠IgG2aFc,粗体字部分为小鼠ANGPTL3全长蛋白的第17至第220位氨基酸。

[0141] 7、食蟹猴全长ANGPTL3:食蟹猴ANGPTL3(17-460)-His,用于检测,其氨基酸序列如下:

**MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDN**SS**FDSVSPEPKSRFAMLDDVKILANG  
 LLQLGHGLKDFVHKT**KGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQ**TSEIKEEEKELR  
 [0142] RTTYKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLL**E**EKILLQ**Q**KV**K**YLEEQ**L**TNLIQ  
 NQPATPEHPEVTSLK**SFVEKQDNSIKDLLQ**TVEEQYKQLN**Q**QHS**Q**IKEIE**

**NQLRMTNIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPADCTTIYNR**  
**GEHISGTYAIRPSNSQVFHVYCDVVSGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENY**  
**KYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLG**  
 [0143] **NHETNYTLHVVKITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAAGHFSCPESYSGG**  
**WWWHDECGENNLNGKYNKPRTKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTK**  
**MLIHPTDSESFEHHHHHHHHHH**

SEQ ID NO: 7

[0144] 注释:下划线部分为信号肽,斜体部分为His序列,粗体字部分为食蟹猴ANGPTL3全长蛋白的第17至第460位氨基酸。

[0145] 8、大鼠全长ANGPTL3:大鼠ANGPTL3(17-455)-His,用于检测,其氨基酸序列如下:  
MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPLSPFDSVPSEPKSRFAMLDDVKILANG  
**LLQLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQCFYDLSLQTNEIKEEEKEL**  
**RRTTSKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLSEKMALQHRVRALEEQLTSL**  
**VQNPPGAREHPEVTSLKSFVEQQDNSIRELLQSVVEEQYKQLSQQHIIQIKI**  
**ENQLRKTGIQEPTENSLYSKPRAPRTTPPLHLKEAKNIEQDDLPAIDCSAIY**  
 [0146] **NRGEHTSGVYTIRPSSSQVFNVYCDTQSGTPRTLIQHRKDGSDQNFNQWTE**  
**NYEKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVKQSNYILRLELQDWKDSKHIAEYSF**  
**HLGNHETNYTLHVAEIAANIPEALPEHRDLMFSTWDHRAKGQLYCPESS**  
**GGWWFSDMCGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGISWRPRGGKLYSIKSS**  
**KMMLQPTTHHHHHHHHHH**

SEQ ID NO: 8

[0147] 注释:划横线部分为信号肽,斜体部分为His序列,粗体字部分为大鼠ANGPTL3全长蛋白的第17至第455位氨基酸。

[0148] 实施例2、ANGPTL3抗原蛋白、杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

[0149] 一、带His标签的重组蛋白或带Flag-his标签的重组蛋白的纯化

[0150] 将细胞表达样品高速离心去除细胞和不溶杂质,收集上清并加入咪唑至终浓度为5mM。用含有5mM咪唑的PBS溶液平衡镍柱,冲洗2-5倍柱体积。将细胞上清上柱。用含有5mM咪唑的PBS溶液冲洗柱子,至A280读数降至基线。然后用PBS+10mM咪唑冲洗层析柱,除去非特异结合的杂蛋白,并收集流穿液。再用含有300mM咪唑的PBS溶液洗脱目的蛋白,并收集洗脱峰。

[0151] 收集的洗脱液用Superdex凝胶过滤柱进行进一步精纯,分管收集。所得到的样品经过SDS-PAGE,肽图,LC-MS鉴定为正确后分装备用。得到带His标签的重组蛋白或带Flag-his标签的重组蛋白。

[0152] 二、杂交瘤抗体或带mFc标签的重组蛋白的纯化

[0153] 将样品高速离心去除细胞及不溶性杂质,留上清。使用1×PBS平衡Protein A亲和柱,冲洗2-5倍柱体积。将离心后的细胞表达上清样品上柱。用1×PBS冲洗柱子,至A280读数降至基线。用1×PBS冲洗柱子。用0.1M乙酸(pH3.5-4.0)洗脱目的蛋白,并收集,之后立即用1M Tris-HCl(pH 7.0)调节洗脱蛋白pH至中性,最后透析或者浓缩换液至1×PBS缓冲液中。

收集样品,经电泳、肽图、LC-MS鉴定正确后分装备用。得到带mFc标签的重组蛋白或杂交瘤抗体。

[0154] 三、抗体、带Fc标签的重组蛋白的纯化

[0155] 将样品高速离心去除细胞及不溶性杂质,留上清。使用1×PBS平衡Protein G亲和柱,冲洗2-5倍柱体积。将离心后的细胞表达上清样品上柱。用1×PBS冲洗柱子,至A280读数降至基线。用1×PBS冲洗柱子。用乙酸(pH 3.0)洗脱目的蛋白,并收集,之后立即用1M Tris-HCl(pH 7.0)调节洗脱蛋白pH至中性,最后透析或者浓缩换液至1×PBS缓冲液中。收集样品经电泳、肽图、LC-MS鉴定正确后分装备用。得到抗体或者带hFc标签的重组蛋白。

[0156] 实施例3、抗ANGPTL3抗体的制备

[0157] 一、通过噬菌体库筛选抗ANGPTL3人源抗体

[0158] 人源噬菌体单链抗体库进行包装浓缩,将噬菌体库( $10^{12} \sim 10^{13}$ /pfu)悬浮于1ml 2%MPBS(含有2%脱脂奶粉的PBS)中,并加入100μl Dynabeads®M-280链霉亲和素(Invitrogen Cat No.11206D),置于转台上反复翻转,室温封闭1小时。将管子置于磁力架上2分钟,去除Dynabeads,噬菌体库转移至新的管子中。向封闭后的噬菌体库中加入2μg/ml生物素标记的人ANGPTL3(17-460)-His,置于转台上反复翻转1小时。同时取100μl Dynabeads悬浮于1ml 2%MPBS中,置于转台上反复翻转,室温封闭1小时。将管子置于磁力架上2分钟,吸去封闭液。将封闭后的Dynabeads加入到噬菌体库和人ANGPTL3(17-460)-His混合液中,置于转台上反复翻转15分钟。将管子置于磁力架上2分钟,吸去混合液。用1ml PBST(含0.1%Tween-20的PBS)洗Dynabeads 10次,再加入0.5ml 1mg/ml胰蛋白酶(Sigma Cat No.T1426-250MG),置于转台上反复翻转孵育15分钟,进行洗脱,将洗脱下来的噬菌体感染大肠杆菌TG1涂平板,随机挑取单克隆,用于噬菌体ELISA。

[0159] 将克隆接种于96孔深孔板(Nunc Cat No.260251)37度培养16~18小时。取少量接种至另一个96孔深孔板,至OD600达到0.5左右,加入M13K07辅助噬菌体(NEB Cat No.N0315S)进行包装。4000g离心10分钟去除菌体,吸取培养液进行ANGPTL3结合ELISA检测。阳性克隆菌种冻存保种并送测序公司测序。其中,测得阳性克隆P3、P8对应的氨基酸序列如下:

[0160] >P3重链可变区序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFDYYLHWLRQAPGQGPEWMGWISP  
NSGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDIATLGNFFT

[0161] YGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 9

[0162] >P3轻链可变区序列:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS

[0163] GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSSWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 10

[0164] >P8重链可变区序列:

[0165] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR  
DDSTSYAQKFQGRTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY  
GMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 11

[0166] >P8轻链可变区序列:

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGRLL  
*EIK*

SEQ ID NO: 12

[0168] 备注:序列中下划线部分为根据Kabat编号系统确定的CDR序列,斜体为FR序列。

[0169] 二、抗ANGPTL3抗体的突变

[0170] 以P8抗体的三维结构为基础,将P8重链可变区的第55位氨基酸残基(自然顺序编号)由D突变为E,将P8轻链可变区的第34位氨基酸残基(自然顺序编号)由G突变为V,得到新的抗体分子P8B,P8B的氨基酸序列如下:

[0171] >P8B重链可变区序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR  
EDSTSYAQKFQGRTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY  
GMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 13

[0173] >P8B轻链可变区序列:

DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGRLL  
*EIK*

SEQ ID NO: 14

[0175] 备注:序列中下划线部分为根据Kabat编号系统确定的CDR序列,斜体为FR序列。

[0176] 表2. 抗ANGPTL3抗体分子的CDR序列

| 抗体分子 | 轻链 CDR |                                  | 重链 CDR |                                   |
|------|--------|----------------------------------|--------|-----------------------------------|
|      |        |                                  |        |                                   |
| P3   | LCDR1  | RASQGIRNDLG (SEQ ID NO: 15)      | HCDR1  | DYYLH (SEQ ID NO: 18)             |
|      | LCDR2  | AASSLQS (SEQ ID NO: 16)          | HCDR2  | WISPNSGGTSYAQKFQG (SEQ ID NO: 19) |
|      | LCDR3  | QSYSSWT (SEQ ID NO: 17)          | HCDR3  | DIATLGNFFTYGMDV (SEQ ID NO: 20)   |
| P8   | LCDR1  | RSSQSLHNSNGYTYLD (SEQ ID NO: 21) | HCDR1  | SYDIN (SEQ ID NO: 24)             |
|      | LCDR2  | LGSNRAS (SEQ ID NO: 22)          | HCDR2  | LINPRDDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO: 25) |
|      | LCDR3  | MQALQTPLT (SEQ ID NO: 23)        | HCDR3  | DLGSIREVLYYGMDV (SEQ ID NO: 26)   |
| P8B  | LCDR1  | RSSQSLHNSNVYTYLD (SEQ ID NO: 27) | HCDR1  | SYDIN (SEQ ID NO: 24)             |
|      | LCDR2  | LGSNRAS (SEQ ID NO: 22)          | HCDR2  | LINPREDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO: 28) |
|      | LCDR3  | MQALQTPLT (SEQ ID NO: 23)        | HCDR3  | DLGSIREVLYYGMDV (SEQ ID NO: 26)   |

[0178] 三、抗ANGPTL3抗体的构建和表达

[0179] 设计引物PCR搭建抗体VH/VK基因片段,再与表达载体pHr(带信号肽及恒定区基因(CH1-FC/CL)片段)进行同源重组,构建抗体全长表达载体VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。抗体的重链恒定区可选自人IgG1、IgG2、IgG4及其变体的恒定区,轻链恒定区可选自人源κ、λ链或其变体的轻链恒定区。示例性的,抗体重链恒定区选自序列如SEQ ID NO:29所示的人IgG4-YTE变体,轻链恒定区选自序列如SEQ ID NO:30所示的人κ链的恒定区。

[0180] 人IgG4-YTE变体重链恒定区序列:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGPCC

[0181] PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS  
SIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCSVMHEALHN

[0182] HYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 29

[0183] 人κ链轻链恒定区序列:

[0184] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C

SEQ ID NO: 30

[0185] 示例性地,上述轻链/重链恒定区与前述P3、P8、P8B的可变区组合形成完整的抗ANGPTL3抗体:P3G、P8G、P8BG,抗体的轻链/重链序列如下:

[0186] >P3G重链序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDY<sup>Y</sup>LHWLRQAPGQGPEWMGWISP  
NSGGTSYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDIATLGNFFT  
YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV  
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV<sup>D</sup>HKPS  
[0187] NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV  
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 31

[0188] >P3G轻链序列:

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS  
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSSWTFGQGTKVEIKRTVAAP  
[0189] SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 32

[0190] >P8G重链序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR  
DDSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY  
[0191] GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV<sup>D</sup>HKPSN  
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVD  
VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL  
[0192] VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 33

[0193] >P8G轻链序列:



[0194] DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPLTFGQGTRL  
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG  
 NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
 RGEC

SEQ ID NO: 34

[0195] &gt;P8BG重链序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR  
EDSTSYAQKFKQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY  
GMDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT  
 VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSN  
 TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVD  
 [0196] VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  
 GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL  
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 35

[0197] &gt;P8BG轻链序列:

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYL  
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPLTFGQGTRL  
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG  
 [0198] NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
 RGEC

SEQ ID NO: 36

[0199] 以下用生化测试方法验证本披露的抗体的活性

[0200] 测试例1. 抗ANGPTL3抗体结合ANGPTL3蛋白的ELISA实验

[0201] 抗ANGPTL3抗体通过与ANGPTL3蛋白结合来抑制或者干扰ANGPTL3蛋白的至少一种活性。用ELISA实验检测抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3抗原的结合活性。ANGPTL3蛋白(人ANGPTL3 (17-170) -mFc) 通过与包被在酶标板中的羊抗鼠IgG结合从而固定到96孔酶标板中,根据抗体加入后信号的强弱判断抗体和ANGPTL3的结合活性。同时用生物素标记试剂盒(东仁化学,LK03) 标记的带HIS标签的ANGPTL3蛋白(小鼠ANGPTL3 (17-455) -His、食蟹猴ANGPTL3 (17-460) -His、大鼠ANGPTL3 (17-455) -His) 通过与包被在酶标板中的链霉亲和素结合从而固定到96孔酶标板中,根据抗体加入后信号的强弱判断抗体和ANGPTL3的结合活性。

[0202] 用pH7.4的PBS(上海源培,B320) 缓冲液将羊抗鼠IgG(Sigma,M3534-1ML) 稀释至2μg/ml浓度,以50μl/孔的体积加入96孔酶标板(Corning,CLS3590-100EA) 中,于37℃孵育箱中放置3小时或4℃放置过夜(16-18小时)。弃去液体后,加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶(BD,

232100) 封闭液250 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育3小时或4 $^{\circ}$ C 放置过夜 (16-18小时) 进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用PBST缓冲液 (pH7.4PBS含0.05%吐温-20) 洗板3次后, 加入50 $\mu$ l/孔用样品稀释液 (pH7.4PBS含1%BSA) 稀释至0.5 $\mu$ g/ml人ANGPTL3 (17-170) -mFc (序列如SEQ ID NO:3) 置37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小时。孵育结束后, 弃去酶标板中的反应液, 用PBST洗板3次后, 加入50 $\mu$ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 放于37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小时。孵育结束后用PBST洗板3次, 加入50 $\mu$ l/孔用样品稀释液稀释的羊抗人二抗 (Jackson Immuno Research, 109-035-003), 37 $^{\circ}$ C 孵育1小时。用PBST洗板3次后, 加入50 $\mu$ l/孔TMB显色底物 (KPL, 52-00-03), 于室温孵育2-5分钟 (min), 加入50 $\mu$ l/孔1M $H_2SO_4$ 终止反应, 用VersaMax酶标仪在450nm处读取吸收值, 计算抗ANGPTL3抗体对ANGPTL3抗原蛋白的结合的EC50值。实验结果见表3。

[0203] 用pH7.4的PBS (上海源培, B320) 缓冲液将链霉亲和素 (Sigma, S4762-5MG) 稀释至3 $\mu$ g/ml浓度, 以50 $\mu$ l/孔的体积加入96孔酶标板 (Corning, CLS3590-100EA) 中, 于37 $^{\circ}$ C 孵育箱中放置3小时或4 $^{\circ}$ C 放置过夜 (16-18小时)。弃去液体后, 加入用PBS稀释的5%脱脂牛奶 (BD, 232100) 封闭液250 $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育3小时或4 $^{\circ}$ C 放置过夜 (16-18小时) 进行封闭。封闭结束后, 弃去封闭液, 并用PBST缓冲液 (pH7.4PBS含0.05%吐温-20) 洗板3次后, 加入50 $\mu$ l/孔用样品稀释液 (pH7.4PBS含1%BSA) 稀释至0.5 $\mu$ g/ml的生物素标记的小鼠ANGPTL3 (17-455) -His (序列如SEQ ID NO:5)、食蟹猴ANGPTL3 (17-460) -His (序列如SEQ ID NO:7)、大鼠ANGPTL3 (17-455) -His (序列如SEQ ID NO:8), 置37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小时。孵育结束后, 弃去酶标板中的反应液, 用PBST洗板3次后, 加入50 $\mu$ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 放于37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小时。孵育结束后用PBST洗板3次, 加入50 $\mu$ l/孔用样品稀释液稀释的HRP标记的羊抗鼠二抗 (Jackson Immuno Research, 115-035-003) 或者是羊抗人二抗 (Jackson Immuno Research, 109-035-003) 或者小鼠HRP/抗M13偶联的二抗 (义翘神州, Cat No. 11973-MM05-100, 用于噬菌体筛选), 37 $^{\circ}$ C 孵育1小时。用PBST洗板3次后, 加入50 $\mu$ l/孔TMB显色底物 (KPL, 52-00-03), 于室温孵育2-5分钟 (min), 加入50 $\mu$ l/孔1M $H_2SO_4$ 终止反应, 用VersaMax酶标仪在450nm处读取吸收值, 计算抗ANGPTL3抗体对ANGPTL3抗原蛋白的结合的EC50值。实验结果见表3, 实验结果显示, 本披露的抗ANGPTL3抗体能够结合不同种属的ANGPTL3蛋白。

[0204] 表3. 抗ANGPTL3抗体与不同种属ANGPTL3蛋白结合ELISA实验

| 抗体   | 与人 ANGPTL3 结合 EC50(nM) | 与小鼠 ANGPTL3 结合 EC50(nM) | 与食蟹猴 ANGPTL3 结合 EC50(nM) | 与大鼠 ANGPTL3 结合 EC50(nM) |
|------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| P3G  | 2.480                  | 1.631                   | 4.555                    | 1.441                   |
| P8G  | 0.361                  | 1.732                   | 2.528                    | 2.115                   |
| P8BG | 0.172                  | 0.105                   | 0.200                    | 0.528                   |

[0205] 测试例2. 抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3抗原蛋白的HTRF结合实验

[0207] HTRF实验同样被用来检测抗ANGPTL3抗体与抗原的结合活性。用生物素标记试剂盒 (东仁化学, LK03) 标记的带HIS标签的ANGPTL3 (人ANGPTL3 (17-460) -His, 小鼠ANGPTL3 (17-455) -His, 食蟹猴ANGPTL3 (17-460) -His, 大鼠ANGPTL3 (17-455) -His) 与HTRF试剂

Streptavidin-Tb cryptata (Cisbio, 610SATLA) 结合, 抗体加入后, 抗体会分别与HTRF试剂 Pab抗小鼠IgG-XL665 (Cisbio, 61PAMXLA) 以及血管生成素样蛋白3结合, 信号的强弱被用于判断抗体和血管生成素样蛋白3的结合活性。

[0208] 用稀释液 (pH7.4PBS含1%BSA) 配置4 $\mu$ g/ml的生物素标记的人ANGPTL3 (17-460) -His (序列如SEQ ID NO:1所示), 小鼠ANGPTL3 (17-455) -His (序列如SEQ ID NO:5所示), 食蟹猴ANGPTL3 (17-460) -His (序列如SEQ ID NO:7所示), 大鼠ANGPTL3 (17-455) -His (序列如SEQ ID NO:8所示), 5 $\mu$ l/孔加入到384孔板中 (PerkinElmer, optiplate-384), 然后加入5 $\mu$ l/孔的HTRF试剂Streptavidin-Tb cryptata以及Pab抗鼠IgG-XL665的混合液, 最后加入10 $\mu$ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 放在25 $^{\circ}$ C孵育1小时。用PHERAstar FS (BMG LabTECH) 在HTRF模块读取数值, 计算抗ANGPTL3抗体对血管生成素样蛋白3的结合EC50值。实验结果见表4, 实施结果表明, 本披露的抗体对人、小鼠、食蟹猴、大鼠等种属的ANGPTL3抗原均具有良好的结合活性。

[0209] 表4. 抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3蛋白的HTRF结合实验

| 抗体   | 与 ANGPTL3 蛋白结合的 EC50(nM) |            |             |            |
|------|--------------------------|------------|-------------|------------|
|      | 人 ANGPTL3                | 小鼠 ANGPTL3 | 食蟹猴 ANGPTL3 | 大鼠 ANGPTL3 |
| P3G  | 0.929                    | 0.638      | 0.502       | 0.597      |
| P8G  | 0.784                    | 0.450      | 0.303       | 0.484      |
| P8BG | 0.277                    | 0.321      | 0.360       | 0.362      |

[0211] 测试例3. 抗ANGPTL3抗体抑制LPL的酶活实验

[0212] LPL的酶活检测实验用来检测抗ANGPTL3抗体阻断ANGPTL3蛋白对LPL酶抑制作用的活性。

[0213] 用稀释缓冲液 (pH7.4PBS+2mg/ml BSA) 稀释牛LPL (Sigma, L2254-5KU) 到12.5单位, 25 $\mu$ l/孔加入到96孔板中 (Corning, 3603), 然后加入25 $\mu$ l/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 再加入25 $\mu$ l/孔浓度为27.6 $\mu$ g/mL的ANGPTL3蛋白 (人ANGPTL3 (17-170) -Flag-His (序列如SEQ ID NO:2)、小鼠ANGPTL3 (17-455) -His (序列如SEQ ID NO:5)、食蟹猴ANGPTL3 (17-460) -His (序列如SEQ ID NO:7)、大鼠ANGPTL3 (17-455) -His (序列如SEQ ID NO:8)), 将96孔板在振荡器上振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育30min。最后加入25 $\mu$ l/孔用稀释缓冲液稀释的20 $\mu$ M的底物 (Sigma, 30058-10MG-F), 将96孔板在振荡器上振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育30min。在Flexstation3酶标仪以Ex535/Em612读数。用Graphpad Prism 5软件处理浓度和对应荧光值数据, 并计算IC50。实验结果见表5, 实施结果表明, 本披露的抗体具有良好的LPL酶抑制作用。

[0214] 表5. 抗ANGPTL3抗体阻断不同种属ANGPTL3抑制LPL的活性实验结果

| 抗体   | IC50(nM)  |            |              |            |
|------|-----------|------------|--------------|------------|
|      | 人 ANGPTL3 | 小鼠 ANGPTL3 | Cyno ANGPTL3 | 大鼠 ANGPTL3 |
| P3G  | 68.9      | 167.5      | 42.4         | 66.5       |
| P8BG | 75.3      | 41.5       | 53.6         | 132.2      |

[0216] 测试例4. 抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3蛋白的Biacore检测实验

[0217] 用Biacore测定待测抗ANGPTL3抗体和人、猴、大鼠及小鼠ANGPTL3的亲合力。方法如下：

[0218] 分别用Protein A生物传感芯片 (Cat.#29127556,GE) 亲和捕获一定量的待测抗体,然后于芯片表面流经一定浓度的人、猴、大鼠及小鼠的ANGPTL3抗原(人-ANGPTL3 (R&D, 3829-AN)、小鼠ANGPTL3 (17-455)-His (序列如SEQ ID NO:5)、食蟹猴ANGPTL3 (17-460)-His (序列如SEQ ID NO:7)、大鼠ANGPTL3 (17-455)-His (序列如SEQ ID NO:8))。利用Biacore T200仪器实时检测反应信号从而获得结合和解离曲线。在每个循环解离完成后,使用pH1.5的甘氨酸-盐酸再生溶液 (Cat.#BR-1003-54,GE) 将生物芯片洗净再生。试验运行缓冲液为1×HBS-EP缓冲溶液 (Cat.#BR-1001-88,GE)。试验得到的数据用GE Biacore T200评估软件3.0版本以(1:1)Langmuir模型进行拟合,得出亲合力数值。实验结果见表6,实验结果表明,本披露的抗ANGPTL3抗体能与人、食蟹猴、大鼠及小鼠的ANGPTL3抗原以高亲合力结合。

[0219] 表6. 抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3蛋白的Biacore检测实验结果

| 抗体   | 抗原          | 结合常数<br>(1/Ms) | 解离常数<br>(1/s) | 亲合力<br>(M) |
|------|-------------|----------------|---------------|------------|
| P3G  | 人 ANGPTL3   | 2.56E+06       | 7.31E-04      | 2.85E-10   |
|      | 食蟹猴 ANGPTL3 | 4.15E+06       | 8.47E-04      | 2.04E-10   |
|      | 小鼠 ANGPTL3  | 9.81E+05       | 8.27E-04      | 8.43E-10   |
|      | 大鼠 ANGPTL3  | 1.28E+06       | 8.20E-04      | 6.39E-10   |
| P8G  | 人 ANGPTL3   | 2.20E+06       | 3.33E-04      | 1.51E-10   |
|      | 食蟹猴 ANGPTL3 | 8.37E+06       | 4.97E-04      | 5.93E-11   |
|      | 小鼠 ANGPTL3  | 9.70E+05       | 3.45E-04      | 3.55E-10   |
|      | 大鼠 ANGPTL3  | 1.34E+06       | 3.35E-04      | 2.50E-10   |
| P8BG | 人 ANGPTL3   | 6.14E+06       | 2.76E-04      | 4.50E-11   |
|      | 食蟹猴 ANGPTL3 | 5.18E+06       | 3.98E-04      | 7.69E-11   |
|      | 小鼠 ANGPTL3  | 1.46E+06       | 4.20E-04      | 2.88E-10   |
|      | 大鼠 ANGPTL3  | 1.21E+06       | 3.11E-04      | 2.57E-10   |

[0221] 测试例5. 抗ANGPTL3抗体大鼠体内药效评价

[0222] 一、P8BG抗体在大鼠体内降脂实验

[0223] 实验用SD大鼠于实验室环境适应性饲养1周(4周龄SD大鼠,SPF,100g左右,雄性,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。合格证号:20170005013017,SCXK(沪)2017-0005),给予12/12小时光/暗周期调节,温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,湿度40~50%,动物均给予标准灭菌鼠饲料,自由进食饮水。在实验开始前7天,动物禁食4h后眼眶采血,3500RPM离心15min,取血清。利用ADVIA2400化学系统(Siemens)测定血清脂质浓度(甘油三酯)。将大鼠按甘油三酯水平分6组(非相关同型人IgG蛋白(hIgG,以下同)作为阴性对照组、Evinacumab(序列结构参见WHO Drug Information,Vol.29,No.3,2015中的Evinacumab序列)3.5mpk组、Evinacumab7mpk组、P8BG3.5mpk组、P8BG1.75mpk组、P8BG7mpk组),每组6只大鼠,皮下注射给药一次,于注射后第1天、第5天、第9天、第13天和第16天将各组大鼠禁食4小时后采血分离血清,用ADVIA 2400化学系统(Siemens)测定血清脂质浓度(甘油三酯)。实验数据表示为平均值±标准差(Mean±SEM),并Graphpad Prism5软件作图,采用TTEST进行统计学分析。

[0224] 实验结果见图1及表7所示,与阴性对照组相比,给药1天后,各治疗组甘油三酯均

下降,除了Evinacumab3.5mpk组,其余各组均有统计差异,实验过程中,P8BG7mpk组的甘油三酯最大下降83.7%,P8BG3.5mpk组甘油三酯最大下降81.8%,P8BG1.75mpk组甘油三酯最大下降68.7%;给药5天后,P8BG3.5mpk组、P8BG1.75mpk组、P8BG7mpk组组甘油三酯下降仍有统计差异,而Evinacumab3.5mpk组、Evinacumab7mpk组无统计差异;给药9天后,P8BG7mpk组和P8BG3.5mpk组仍有统计差异。这说明,同一剂量下P8BG比Evinacumab的降甘油三酯效果更好也更为持久。而且实验过程中各组动物体重正常。

[0225] 表7.P8BG抗体对大鼠血清甘油三酯的影响

| 抗体           | Evinacumab |            | P8BG       |            |            |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|              | 7mpk       | 3.5mpk     | 7mpk       | 3.5mpk     | 1.75mpk    |
| 皮下给药剂量       | 7mpk       | 3.5mpk     | 7mpk       | 3.5mpk     | 1.75mpk    |
| 开始 TG(mg/dL) | 121.5±17.0 | 122.2±17.1 | 120.1±14.3 | 122.6±15.6 | 120.9±16.1 |
| 最低 TG 水平     | 131.1±12.5 | 109.7±16.7 | 27.6±3.1   | 34.2±4.7   | 72.6±10.9  |
| Max Inh %    | 40.7%      | 13.1%      | 83.7%      | 81.8%      | 68.7%      |

[0227] 备注:Max Inh%表示相对于阴性对照组TG的最大降脂百分比,mpk表示mg/kg,

[0228] 二、P3G抗体在大鼠体内降脂实验

[0229] 实验用SD大鼠于实验室环境适应性饲养1周(4周龄SD大鼠,SPF,雄性,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。合格证号:20170005013017,SCXK(沪)2017-0005),给予12/12小时光/暗周期调节,温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,湿度40~50%,动物均给予标准灭菌鼠饲料,自由进食饮水。在实验开始前7天,动物禁食4h后眼眶采血,3500RPM离心15min,取血清。利用ADVIA 2400化学系统(Siemens)测定血清脂质浓度(甘油三酯)。将大鼠按甘油三酯水平分4组(hIgG阴性对照组、Evinacumab3.5mpk组、P3G3.5mpk组、P3G7mpk组),每组6只大鼠,皮下注射给药一次,于注射后第1天、第5天、第9天和第13天将各组大鼠禁食4小时后采血分离血清,用ADVIA 2400化学系统(Siemens)测定血清脂质浓度(甘油三酯)。实验数据表示为平均值±标准差(Mean±SEM),并用Graphpad Prism5软件作图,采用TTEST进行统计学分析。

[0230] 实验结果见图2所示,与hIgG阴性对照组相比,给药1天后各组甘油三酯均下降,且P3G3.5mpk组、P3G7mpk组甘油三酯降幅大于Evinacumab 3.5mpk组;给药9天后,P3G3.5mpk组和P3G7mpk组血清脂质浓度仍低于阳性对照。

[0231] 测试例6.在高脂高胆固醇喂养c57b1/6小鼠中测定抗ANGPTL3抗体对血浆脂质浓度的体内效应

[0232] c57b1/6小鼠按5只/笼饲养(4周龄c57b1/6小鼠,SPF,16-18g左右,雄性,购自上海卡文斯实验动物有限责任公司。合格证号:201913812,SCXK(苏)2016-0010),于实验室环境适应性饲养4周,给予12/12小时光/暗周期调节,温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,湿度40~50%,动物均给予普通饲料喂养,自由进食饮水。预采血5天后将普通饲料换成高脂高胆固醇饲料(D12079B,购自:江苏省协同医药生物工程有限责任公司)喂养小鼠,直到实验结束。在实验开始前8天为动物禁食,禁食4小时后眼眶采血,8000RPM离心2min,收集血浆。利用ADVIA 2400化学系统(Siemens)测定血浆脂质浓度。将小鼠按甘油三酯水平分为4组(hIgG阴性对照组、Evinacumab25mpk组、P8BG25mpk组、P8BG5mpk组),每组11只,皮下给药,每周注射一次,共给药8次。于实验开始后第2周,3周,5周,7周,9周,10周和11周时,将各组小鼠禁食4小时后眼

眶采血并收集血浆。利用ADVIA 2400化学系统(Siemens)测定血浆脂质浓度(甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)以及LDL胆固醇(LDL-C))。实验数据表示为平均值±标准差(Mean±SEM),并用Graphpad Prism5软件作图,采用TTEST进行统计学分析。

[0233] 实验结果见表8至表10和图3-5所示,与hIgG阴性对照组相比,实验第2周、3周、5周及7周后P8BG 25mpk组的TG、TC及LDL-C均显著下降;Evinacumab25mpk及P8BG5mpk组在实验3周,5周及7周后TG、TC及LDL-C下降。实验9周后,与hIgG阴性对照组相比,只有P8BG25mpk和P8BG5mpk两组甘油三酯显著下降。与Evinacumab25mpk组相比,实验第2周,第3周,第9周,P8BG25mpk组的甘油三酯及总胆固醇均显著下降;与Evinacumab25mpk组相比,实验第2周、第9周,P8BG 25mpk组的LDL-C显著下降。在第一至第11周的整个实验周期中,Evinacumab25mpk组TG最低降至 $40.5 \pm 2.3$ ,与开始TG相比下降了32.60%;而P8BG25mpk组TG最低降至 $21.1 \pm 1.3$ ,与开始TG相比下降了64.90%。这说明,P8BG抗体比Evinacumab的降血脂效果更为有效且持久。

[0234] 表8. 抗ANGPTL3抗体对c57b1/6小鼠血浆TG的影响

| 抗体              | Evinacumab   | P8BG         |             | hIgG         |
|-----------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| [0235] 皮下每周给药剂量 | <b>25mpk</b> | <b>25mpk</b> | <b>5mpk</b> | <b>25mpk</b> |
| 开始TG(mg/dL)     | 60.1±3.2     | 60.1±4.1     | 60.1±3.8    | 60.0±6.2     |
| [0236] 最低TG水平   | 40.5±2.3     | 21.1±1.3     | 35.5±1.7    | 45.1±7.1     |
| max Inh %       | 32.6%        | 64.9%        | 40.9%       | 24.8%        |

[0237] 备注:max Inh%表示相对于开始TG的最大降脂百分比

[0238] 表9. 抗ANGPTL3抗体对c57b1/6小鼠血浆LDL的影响

| 抗体              | Evinacumab   | P8BG         |             |
|-----------------|--------------|--------------|-------------|
| [0239] 皮下每周给药剂量 | <b>25mpk</b> | <b>25mpk</b> | <b>5mpk</b> |
| Max Inh %       | 28.10%       | 52.10%       | 42.80%      |

[0240] 备注:Max Inh%表示相对于阴性对照组LDL的最大降脂百分比

[0241] 表10. 抗ANGPTL3抗体对c57b1/6小鼠血浆TC的影响

| 抗体              | Evinacumab   | P8BG         |             |
|-----------------|--------------|--------------|-------------|
| [0242] 皮下每周给药剂量 | <b>25mpk</b> | <b>25mpk</b> | <b>5mpk</b> |
| Max Inh %       | 27.50%       | 47.90%       | 36.20%      |

[0243] 备注:Max Inh%表示相对于阴性对照组TC的最大降脂百分比

[0244] 测试例7. 在APOE小鼠中测定抗ANGPTL3抗体对血浆脂质浓度的体内效应

[0245] APOE小鼠按2只/笼饲养(8周龄APOE小鼠,SPF,22g左右,雄性,购自上海卡文斯实验动物有限责任公司。合格证号:201917260,SCXK(苏)2016-0010),于实验室环境适应性饲养4周,给予12/12小时光/暗周期调节,温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ,湿度40~50%,动物均给予高脂饲料(D12108C)喂养,自由进食饮水。在实验开始前7天为动物禁食,禁食4小时(h)后眼眶采血,

8000RPM离心2分钟(min),收集血浆。利用ADVIA2400化学系统(Siemens)测定血浆脂质浓度。将小鼠按甘油三酯水平分为5组(hIgG阴性对照组、Evinacumab10mpk组、Evinacumab5mpk组、P8BG10mpk组、P8BG5mpk组),每组8只,分别皮下注射给药一次(各组给药剂量见表11),给药后的第1天(d)、第7天及第11天分别将各组小鼠禁食4小时后眼眶采血,收集血浆,利用ADVIA 2400化学系统(Siemens)测定血浆脂质浓度(甘油三酯、HDL胆固醇)。实验数据表示为平均值±标准差(Mean±SEM),并用Graphpad Prism5软件作图,采用TTEST进行统计学分析。

[0246] 本次实验结果见图6、7和表11所示,与hIgG阴性对照组相比,给药1d后,各治疗组甘油三酯均下降,Evinacumab(10mpk)组甘油三酯最低降至 $65.6 \pm 5.4$ mg/dL,与开始TG值相比下降了46.2%,Evinacumab(5mpk)组甘油三酯最低降至 $71.8 \pm 3.3$ mg/dL,与开始TG值相比下降了42.1%,P8BG(10mpk)组甘油三酯最低降至 $33.3 \pm 2.2$ mg/dL,与开始TG值相比下降了72.9%,P8BG(5mpk)组甘油三酯最低降至 $37.0 \pm 1.7$ mg/dL,与开始TG值相比下降了70.2%。另外,实验结果显示,给药1天后P8BG10mpk组的血浆HDL-C有所升高,Evinacumab10mpk组血浆HDL-C下降,而在降脂实验中,通常并不希望降脂的同时引起HDL-C的下降。

[0247] 表11.抗ANGPTL3抗体对APOE小鼠血浆甘油三酯的影响

| 抗体                   | Evinacumab |            | P8BG       |            | hIgG       |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                      | 10mpk      | 5mpk       | 10mpk      | 5mpk       | 10mpk      |
| 皮下给药剂量               |            |            |            |            |            |
| [0248] 开始 TG (mg/dL) | 122.0±8.8  | 123.9±17.1 | 122.8±10.7 | 124.0±20.8 | 120.5±14.9 |
| 最低 TG 水平             | 65.6±5.4   | 71.8±3.3   | 33.3±2.2   | 37.0±1.7   | 146.7±21.6 |
| max Inh %            | 46.20%     | 42.10%     | 72.90%     | 70.20%     | -21.70%    |

[0249] 备注:max Inh%表示相对于开始TG的最大降脂百分比

[0250] 测试例8.抗ANGPTL3抗体药代动力学评价

[0251] 一、抗ANGPTL3抗体小鼠体内药代动力学实验

[0252] 体重18-24g的C57BL/6小鼠(购自浙江维通利华实验动物技术有限公司)。实验室环境适应性饲养不小于3天,12/12小时光/暗周期调节,温度16-26℃,相对湿度40-70%,饲养期间自由摄取饲料和水。实验开始前一天,对C57BL/6小鼠进行编号,随机分组,每组3只。实验当天,每组小鼠分别静脉注射受试药物P8BG和Evinacumab,给药剂量为10mg/kg;注射体积均为5ml/kg。

[0253] 给药组于给药前及给药后5min,8h,1d,2d,4d,7d,10d,14d,21d,28d采集全L0.1ml,不加抗凝,取血后在4℃放置30min,1000g离心15min,取上清(血清)置于EP管中,于-80℃保存。

[0254] 采用ELISA方法检测血清中的抗体浓度,采用Winnolin软件计算受试药物的药动学参数。所得主要药动学结果见表12和图8。实验结果表明本披露的P8BG抗体在小鼠体内的半衰期高于阳性对照Evinacumab。

[0255] 表12.抗ANGPTL3抗体在小鼠药代动力学

|        |                              |            |            |
|--------|------------------------------|------------|------------|
|        | 抗体                           | P8BG       | Evinacumab |
| [0256] | 给药方式                         | i.v.       | i.v.       |
|        | 给药剂量(mg/kg)                  | 10         | 10         |
|        | t1/2h                        | 131.4±18.8 | 71.1±6.1   |
| [0257] | t1/2d                        | 5.47±0.78  | 2.96±0.25  |
|        | AUC <sub>0-∞</sub> (h*ug/ml) | 23272±2887 | 16904±4481 |

[0258] 备注:AUC<sub>0-∞</sub>:药时曲线下面积;t1/2(h):半衰期(以小时为单位);t1/2(d):半衰期(以天为单位);i.v.静脉内注射。

[0259] 二、抗ANGPTL3抗体在食蟹猴体内的药代动力学评价

[0260] 使用体重3-4kg的食蟹猴(购自广东前沿生物科技有限公司)。动物转入实验前至少进行14天的检疫驯养。动物饲养于不锈钢笼具中,每组每笼不超过2只。动物房的室温控制在18℃~26℃,相对湿度在40%~70%,光照12小时明暗交替。实验过程中动物自由饮水。根据生化指标将6只食蟹猴中随机分成2组,每组3只动物。每组分别皮下注射受试药物P8BG和Evinacumab,给药剂量为10mg/kg;注射体积均为2ml/kg。

[0261] 分组后动物禁食过夜,分别于给药前、给药开始后1小时(h)、2h、4h、8h、12h、1天(d)、3d、5d、7d、10d、14d、21d、28d、35d、42d、49d和56d于下肢静脉取血2mL左右,置含分离胶的采血管中,取血后于室温放置30分钟(min),1000g离心15min,取上清分装于2个干净的EP管中,-70℃以下暂存(采血后2h内完成)。采用ELISA方法检测血清中的抗体浓度,采用Winnolin软件计算受试药物的药动学参数。所得主要药动学结果见表14和图9。实验结果表明本披露的P8BG抗体在食蟹猴体内的半衰期高于阳性对照Evinacumab。

[0262] 表13. 抗ANGPTL3抗体在食蟹猴药代动力学

|        |                              |             |            |
|--------|------------------------------|-------------|------------|
| [0263] |                              | P8BG        | Evinacumab |
|        | 给药剂量(mg/kg)                  | 10          | 10         |
|        | 给药方式                         | sc.         | sc.        |
|        | t1/2h                        | 324.7±115.3 | 157.7±28.6 |
|        | t1/2d                        | 13.5±4.8    | 6.6±1.2    |
|        | AUC <sub>0-∞</sub> (ug/ml*h) | 44243±7404  | 38027±252  |

[0264] 备注:AUC<sub>0-∞</sub>:药时曲线下面积;t1/2(h):半衰期(以小时为单位);t1/2(d):半衰期(以天为单位);sc.皮下注射。



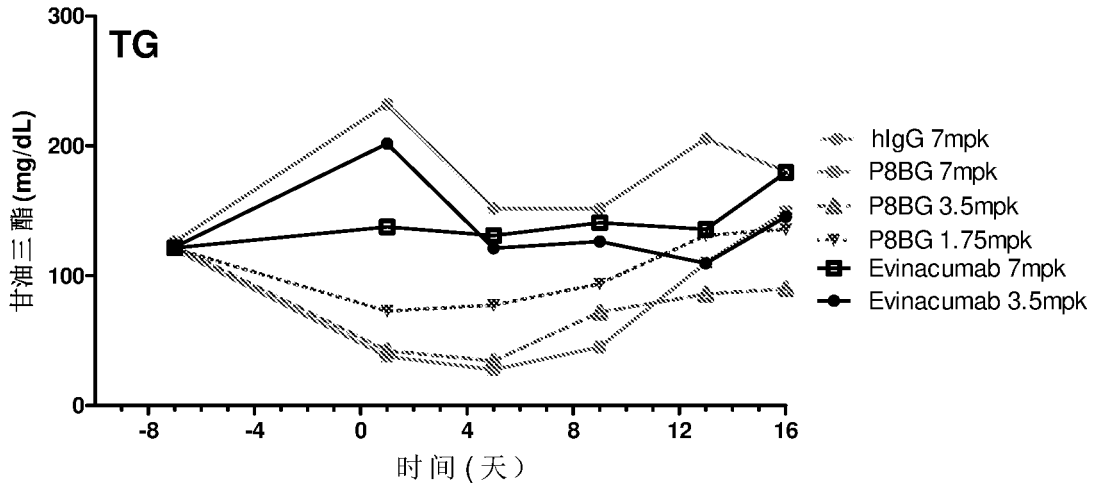


图1

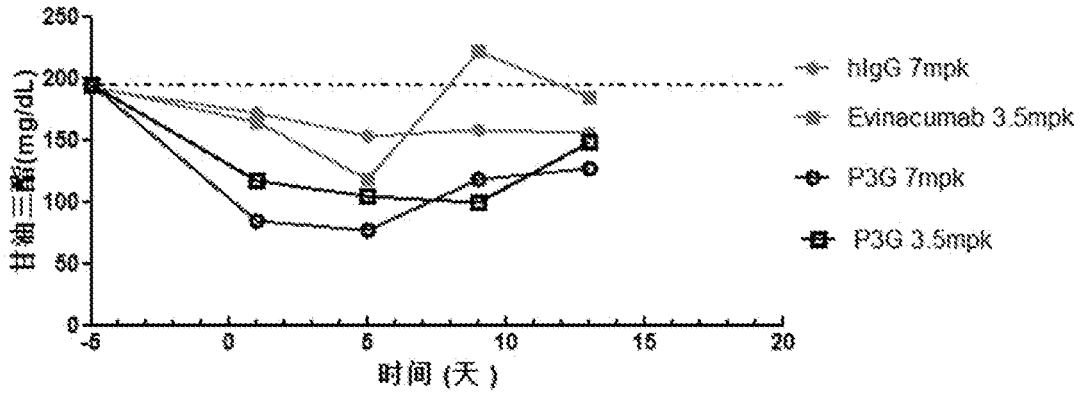


图2

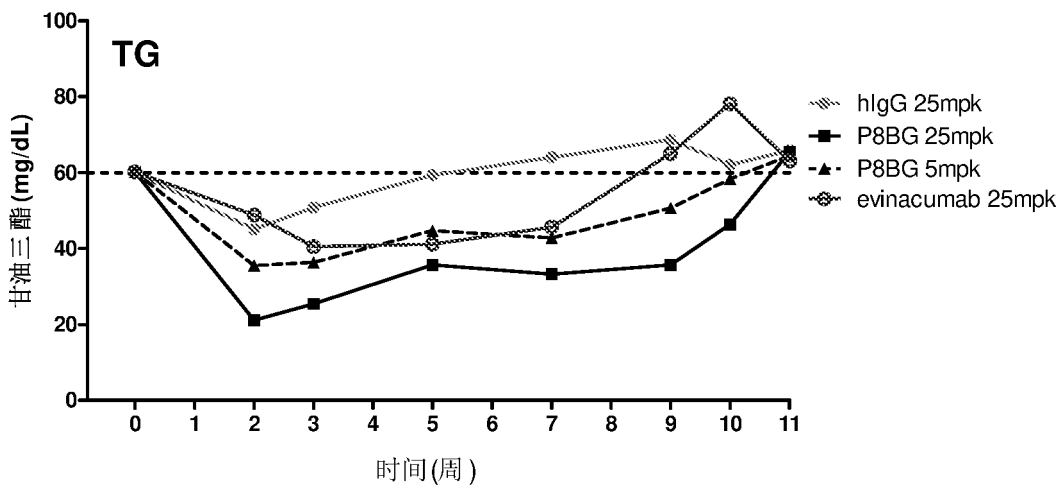


图3

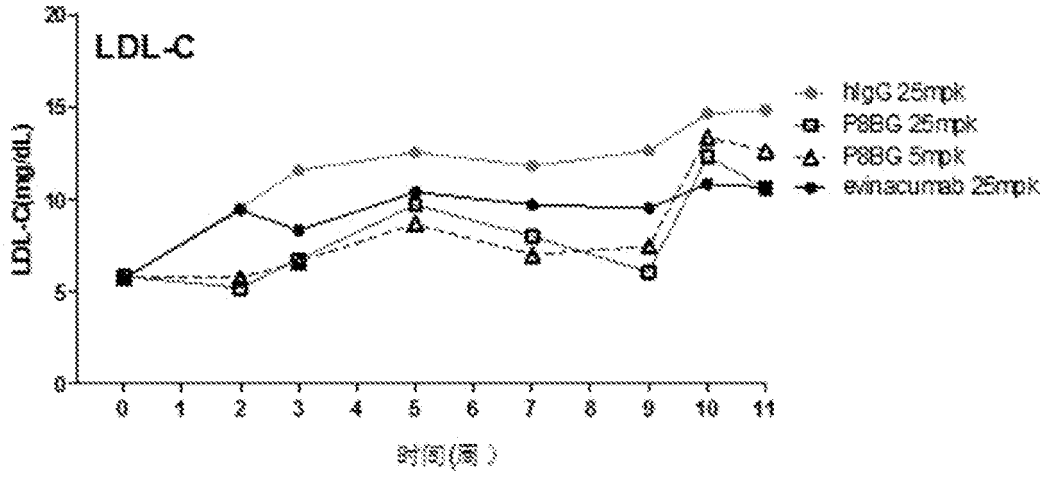


图4

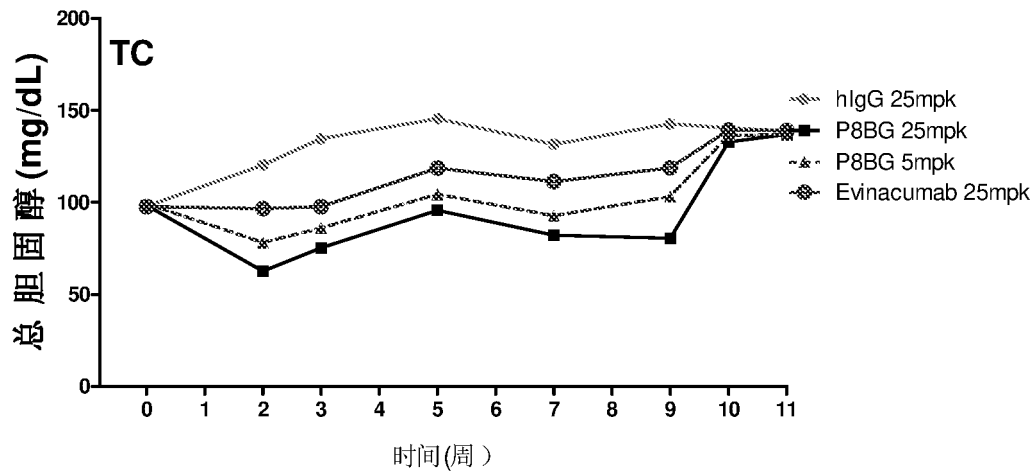


图5

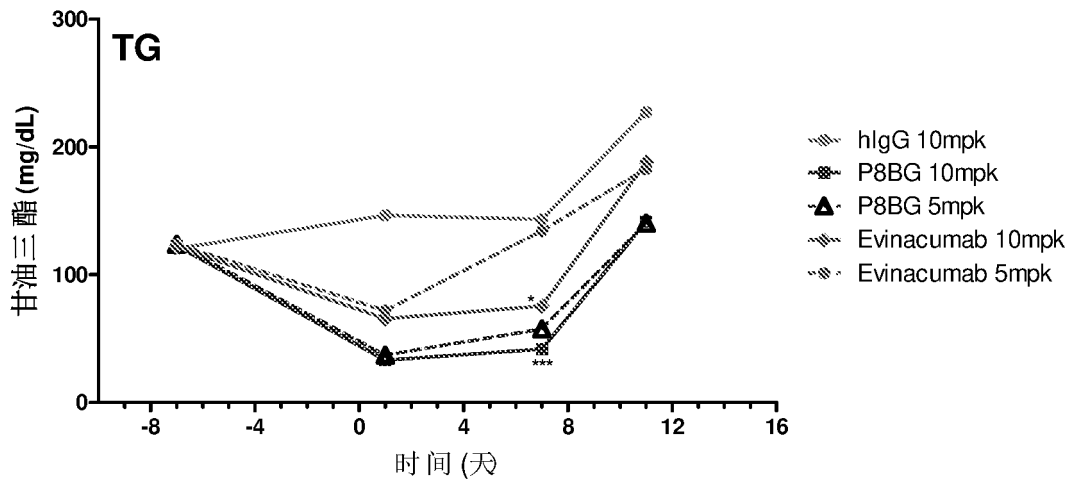


图6

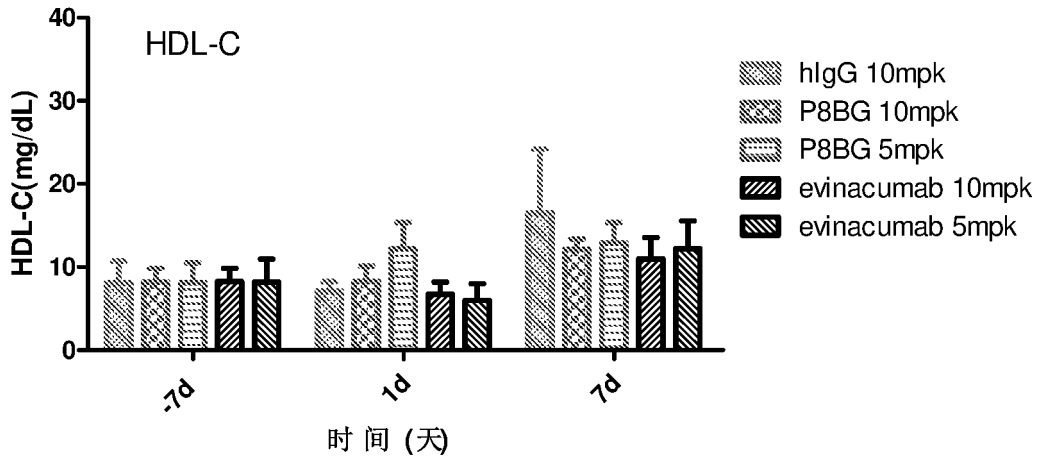


图7

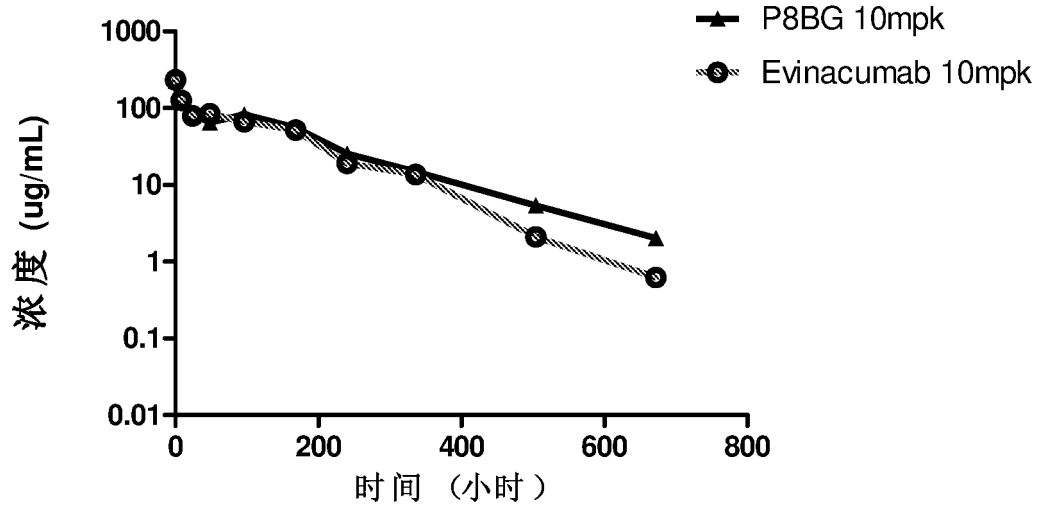


图8

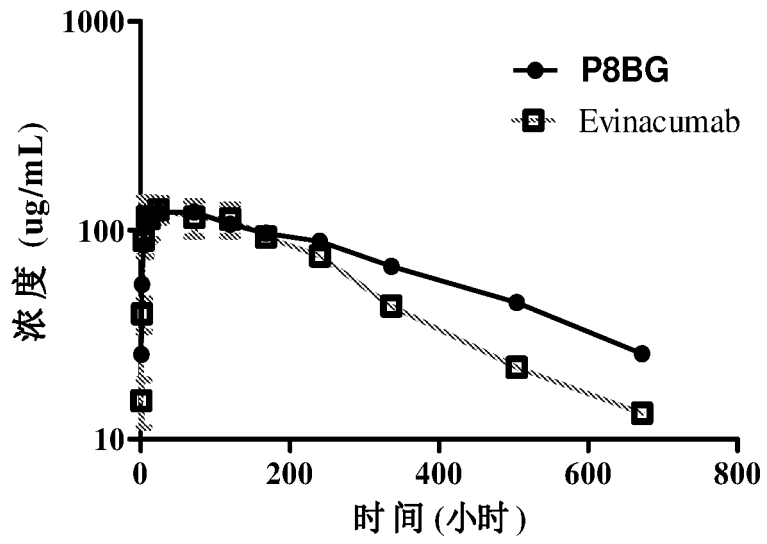


图9