

一种抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的药物组合物及其用途

本申请要求 2021 年 07 月 21 日提交的申请号为 202110822526.8 的中国专利申请的优先权。

技术领域

本公开涉及药物制剂领域，具体涉及一种包含抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的药物组合物及其医药用途。

背景技术

血管生成素样蛋白 3(Angiopoietin-like protein 3, ANGPTL3)是一种分泌蛋白，作为血管生成素样蛋白家族的成员，其主要在肝脏表达。ANGPTL3 的氨基末端卷曲的区域与抑制脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, LPL)活性有关，调节甘油三酯(triglyceride, TG)羧基端纤维蛋白原样区域主要与调节血管生成有关，因此，该蛋白具有调节脂质代谢和促进血管生成的功能。

ANGPTL3 主要作用为调节脂蛋白代谢，通过抑制 LPL 和内皮脂酶(EL)在调节脂质代谢中发挥作用。目前 ANGPTL3 抑制物分为 2 种，一种是 ANGPTL3-ASO，另一种为 ANGPTL3 单克隆抗体如 Evinacumab，二者机制与作用部位不同，ANGPTL3-ASO 主要作用于肝细胞，而 Evinacumab 在血液循环中起效。但无论是从表型还是基因水平上抑制 ANGPTL3 后均有突出且稳定的降脂效果。靶向 ANGPTL3 的 IgG4 亚型的单克隆抗体，能结合 ANGPTL3，通过阻断 ANGPTL3 与 LPL 的结合，解除 ANGPTL3 对 LPL 酶活的抑制，促进血浆中甘油三酯的降解，从而达到治疗高血脂症的目的。

WO2021147984A 提供了一种降血脂效果更好也更为持久的抗 ANGPTL3 抗体及其抗原结合片段。抗体药物分子量大，结构复杂，容易降解、聚合或发生不希望发生的化学修饰等而变得不稳定。为了使抗体适合于给药，并且在储存及随后使用过程中能保持稳定，发挥更好的治疗效果，抗体药物的稳定制剂研究显得尤为重要。因此，对于抗 ANGPTL3 抗体及其抗原结合片段，需要研制较为稳定的制剂。本公开提供一种足够稳定、冻干形态好且更适于给药的包含抗 ANGPTL3 抗体及其抗原结合片段的药物组合物。

发明内容

本公开提供一种药物组合物，其包含抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，以及缓冲剂。以及，本公开提供所述药物组合物用于治疗、预防疾病的方法，及其医药用途。

在一些实施方案中，前述缓冲剂选自醋酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂和枸橼酸缓冲剂中的任一种，例如醋酸盐缓冲剂。

在一些实施方案中，前述缓冲剂选自醋酸-醋酸钠、组氨酸-盐酸盐、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠、琥珀酸-琥珀酸钠和枸橼酸-枸橼酸钠缓冲剂中的任一种，例如醋酸-醋酸钠缓冲剂。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 9 所示氨基酸序列的重链可变区中的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 10 所示氨基酸序列的轻链可变区中的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，一些具体实施方案中，为 Kabat 编号系统定义的。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR1，如 LINPRDDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO: 23) 所示的 HCDR2，和如 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR3；和/或所述轻链可变区包含氨基酸序列如 RSSQSLLSNGYTYLD (SEQ ID NO: 24) 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR2，和如 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR3。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含如 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列的重链可变区的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或所述轻链可变区包含如 SEQ ID NO: 18 所示氨基酸序列的轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。其中，所述 CDR 是根据 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 编号系统定义的，一些具体实施方案中，为 Kabat 编号系统定义的。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和/或所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段选自鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体；在一些具体实施方案中，为人源化抗体。

在一些实施方案中，药物组合物中所述的人源化 ANGPTL3 抗体轻链和重链可变区上的轻链和重链 FR 序列分别来源于人种系轻链和重链的 FR 或其突变序列。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 以上序列同一性，和/或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 以上序列同一性。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 及以上的序列同一性，和/或所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 及以

上的序列同一性。

本公开中，“至少 90%及以上的序列同一性”涵盖至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%及以上的序列同一性。

5 在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

10 在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，其中：所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示。

在一些实施方案中，所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段进一步包含重链恒定区和轻链恒定区。在可选的实施方案中，所述重链恒定区源自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区，所述轻链恒定区源自人 κ 和 λ 链恒定区。

15 在一些实施方案中，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90%及以上的序列同一性，和/或所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90%及以上的序列同一性。

20 在一些实施方案中，所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中：所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90%及以上的序列同一性，和/或所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与之具有至少 80%、至少 85%、至少 90%及以上的序列同一性。

在一些实施方案中，药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链和轻链，其中：所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示，且所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示。

25 在一些实施方案中，本公开所述的抗原结合片段选自：Fab、F(ab')₂、Fab'、Fd、Fv、dsFv、scFv、Fab 和双特异性抗体。

30 在一些实施方案中，药物组合物中所述缓冲剂的 pH 值为 4.0 至 7.0，例如 4.0 至 6.9、4.0 至 6.8、4.0 至 6.7、4.0 至 6.6、4.0 至 6.5、4.0 至 6.4、4.0 至 6.3、4.0 至 6.2、4.0 至 6.1、4.0 至 6.0、4.0 至 5.9、4.0 至 5.8、4.0 至 5.7、4.0 至 5.6、4.0 至 5.5、4.5 至 6.5、4.5 到 6.0、4.5 至 5.5、5.0 至 7.0、5.0 至 6.5、5.0 至 6.0、5.0 至 5.5、4.6 至 6.6、4.6 至 6.5、4.6 至 6.4、4.6 至 6.3、4.6 至 6.2、4.6 至 6.1、4.6 至 6.0、4.6 至 5.9、4.6 至 5.8、4.6 至 5.7、4.6 至 5.6、4.6 至 5.5、4.6 至 5.4、4.8 至 6.6、4.8 至 6.5、4.8 至 6.4、4.8 至 6.3、4.8 至 6.2、4.8 至 6.1、4.8 至 6.0、4.8 至 5.9、4.8 至 5.8、4.8 至 5.7、4.8 至 5.6、4.8 至 5.5、4.8 至 5.4、4.9 至 5.4、5.0 至 5.4；在一些具体实施方案中，所述缓冲剂的 pH 值为约 4.0、约 4.1、约 4.2、约 4.3、
35 约 4.4、约 4.5、约 4.6、约 4.7、约 4.8、约 4.9、约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4、约 5.5、约 5.6、约 5.7、约 5.8、约 5.9、约 6.0、约 6.5、约 6.6、约 6.7、约 6.8、约 6.9、

或者约 7.0, 例如约 5.2。

在一些实施方案中, 药物组合物中所述缓冲剂浓度为 5mM 至 40mM, 例如 5mM 至 30mM、5mM 至 20mM、5mM 至 15mM、5mM 至 10mM、10mM 至 15mM、8mM 至 12mM; 一些具体实施方案中, 所述缓冲剂的浓度为约 5mM、约 6mM、约 7mM、约 8mM、约 9mM、约 10mM、约 11mM、约 12mM、约 13mM、约 14mM、约 15mM、约 18mM、约 20mM, 例如约 10mM。

在一些实施方案中, 药物组合物中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段浓度为 10mg/mL 至 200mg/mL, 例如 50mg/mL 至 200mg/mL、50mg/mL 至 150mg/mL、60mg/mL 至 150mg/mL、60mg/mL 至 120mg/mL、80mg/mL 至 150mg/mL、80mg/mL 至 120mg/mL、90mg/mL 至 120mg/mL、90mg/mL 至 110mg/mL; 一些具体实施方案中, 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段浓度为约 10mg/mL、约 20mg/mL、约 30mg/mL、约 50mg/mL、约 60mg/mL、约 65mg/mL、约 70mg/mL、约 75mg/mL、约 80mg/mL、约 85mg/mL、约 90mg/mL、约 95mg/mL、约 100mg/mL、约 105mg/mL、约 110mg/mL、约 115mg/mL、约 120mg/mL、约 130 mg/mL、约 140 mg/mL、约 150 mg/mL、约 160 mg/mL、约 170 mg/mL、约 180 mg/mL、约 190 mg/mL、约 200 mg/mL、或任意两数值间任意值, 例如约 100mg/mL。

在一些实施方案中, 药物组合物中包含的表面活性剂可选自聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-磺基甜菜碱、肉豆蔻基-磺基甜菜碱、亚油基-磺基甜菜碱、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-肌氨酸、肉豆蔻基-肌氨酸、亚油基-肌氨酸、硬脂基-肌氨酸、亚油基-甜菜碱、肉豆蔻基-甜菜碱、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-甜菜碱、柯卡酰胺基丙基-甜菜碱、亚油酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-甜菜碱、棕榈酰胺基丙基-甜菜碱、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-二甲基胺、棕榈酰胺基丙基-二甲基胺、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。一些具体实施方案中, 所述表面活性剂是聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20, 例如聚山梨醇酯 80。

在一些实施方案中, 药物组合物中表面活性剂的浓度为 0.05mg/mL 至 0.6mg/mL、例如 0.1mg/mL 至 0.6mg/mL、0.1mg/mL 至 0.5mg/mL、0.1mg/mL 至 0.4mg/mL, 例如 0.1mg/mL 至 0.3mg/mL; 一些具体实施方案中, 所述药物组合物中表面活性剂的浓度为约 0.1mg/mL、约 0.15mg/mL、约 0.2mg/mL、约 0.25mg/mL、约 0.3mg/mL、约 0.4mg/mL、约 0.5mg/mL、约 0.6mg/mL, 例如约 0.2mg/mL。

在一些实施方案中, 药物组合物还包括稳定剂。在可选的实施方案中, 其中所述的稳定剂选自糖或氨基酸。在可选的实施方案中, 糖包含常规组合物 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物, 包括单糖、二糖、三糖、多糖、糖醇、还原性糖、非还原性糖等。在可选的实施方案中, 糖可选自葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麦芽糖、右旋糖苷、甘油、赤藻糖醇、丙三醇、阿拉伯糖醇、木糖、山梨糖醇、甘露醇、密里二糖、松三糖、蜜三糖、甘露三糖、水苏糖、麦芽糖、乳果糖、麦芽酮糖、山梨醇、麦芽糖醇、乳糖醇、异-麦芽酮糖等。

一些具体实施方案中,所述糖是非还原性二糖,例如蔗糖。一些具体实施方案中,所述氨基酸选自甘氨酸、甲硫氨酸和脯氨酸。

在一些实施方案中,药物组合物中糖的浓度为 40mg/mL 至 110mg/mL,例如为 40mg/mL 至 95mg/mL、60mg/mL 至 90mg/mL、60mg/mL 至 80mg/mL、70mg/mL 至 90mg/mL、70mg/mL 至 80mg/mL; 一些具体实施方案中,所述糖的浓度为约 60mg/mL、约 65mg/mL、约 70mg/mL、约 75mg/mL、约 80mg/mL、约 85mg/mL、约 90mg/mL 或任意两数值间任意值,例如约 75mg/mL。

本公开提供一种药物组合物,其包含:

(a) 10 mg/mL 至 200 mg/mL(例如,约 50 mg/mL)的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,和

(b) 约 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸缓冲液;

可选地,所述药物组合物的 pH 为 6.0 至 6.6(例如,约 6.0、约 6.6)。

本公开提供一种药物组合物,其包含:

(a) 10 mg/mL 至 200 mg/mL(例如,约 50 mg/mL)的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,和

(b) 约 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲液;

可选地,所述药物组合物的 pH 为 4.6 至 5.0(例如,约 4.6、约 5.0)。

本公开提供一种药物组合物,其包含:

(a) 10 mg/mL 至 200 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,和
(b) 5 mM 至 30 mM 的醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠缓冲液)。

在一些实施方案中,所述药物组合物包含:

(a) 10 mg/mL 至 200 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,
(b) 5 mM 至 30 mM 的醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠缓冲液),
(c) 40 mg/mL 至 90 mg/mL 的糖(例如,蔗糖),和
(d) 0.05 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的表面活性剂(例如,聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20);
可选地,所述药物组合物的 pH 为 4.5 至 6.5,例如 5.0 至 5.4,例如约 5.2。

本公开提供一种药物组合物,其包含:

(a) 10 mg/mL 至 200 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,和
(b) 5 mM 至 20 mM 的醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠缓冲液);
可选地,所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.5。

在一些实施方案中,所述药物组合物包含:

(a) 50 mg/mL 至 150 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,
(b) 5 mM 至 15 mM 的醋酸盐缓冲液(例如,醋酸-醋酸钠缓冲液),
(c) 60 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖,
(d) 0.05 mg/mL 至 0.5 mg/mL 的聚山梨醇酯 80;
可选地,所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 6.0。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含：

(a) 40 mg/mL 至 120 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，

(b) 5 mM 至 15 mM 的醋酸盐缓冲液(例如，醋酸-醋酸钠缓冲液)，

(c) 60 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖，

5 (d) 0.1 mg/mL 至 0.4 mg/mL 的聚山梨醇酯 80；

可选地，所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.8。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含：

(a) 80 mg/mL 至 120 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，

(b) 5 mM 至 15 mM 的醋酸盐缓冲液(例如，醋酸-醋酸钠缓冲液)，

10 (c) 70 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖，

(d) 0.1 mg/mL 至 0.3 mg/mL 的聚山梨醇酯 80；

可选地，所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.5。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含：

(a) 80 mg/mL 至 120 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，

15 (b) 5 mM 至 15 mM 的醋酸盐缓冲液(例如，醋酸-醋酸钠缓冲液)，

(c) 70 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖，

(d) 0.1 mg/mL 至 0.3 mg/mL 的聚山梨醇酯 80；

可选地，所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.5。

在一些实施方案中，所述药物组合物包含：

20 (a) 90 mg/mL 至 110 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，

(b) 8 mM 至 12mM 的醋酸盐缓冲液(例如，醋酸-醋酸钠缓冲液)，

(c) 75 mg/mL 至 85 mg/mL 的蔗糖，

(d) 0.15 mg/mL 至 0.25 mg/mL 的聚山梨醇酯 80；

可选地，所述药物组合物的 pH 为 5.1 至 5.3。

25 在一些实施方案中，所述药物组合物包含：

(a) 约 100mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，

(b) 5 mM 至 15 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液，

(c) 60 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖，

(d) 0.1 mg/mL 至 0.4mg/mL 的聚山梨醇酯 80；

30 可选地，所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 5.4。

在一些具体实施方案中，所述的药物组合物包含：

(1) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，约 75 mg/mL 蔗糖，约 0.1 mg/mL 聚山梨酯 80，和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液，pH 为 5.0 至 5.4(例如，约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4)；

35 (2) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，约 75 mg/mL 蔗糖，约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80，和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液，pH 为 5.0 至 5.4(例如，约 5.0、约

5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(3) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 75 mg/mL 蔗糖, 约 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

5 (4) 约 80 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 75 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(5) 约 120 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 75 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 10 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(6) 约 150 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 75 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(7) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 60 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 15 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(8) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 65 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

20 (9) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 70 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(10) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 80 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 25 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(11) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 90 mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(12) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 75mg/mL 蔗糖, 约 0.2 30 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 5mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4);

(13) 约 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段, 约 75mg/mL 蔗糖, 约 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和约 15mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4(例如, 约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4)。

35 上述实施方案中, 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段选自:

1) 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段含有重链可变区和轻链可变区, 所述轻

链可变区含有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，和所述重链可变区含有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

2) 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:17 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示；

3) 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链和轻链，所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示，且所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；

4) 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段含有重链可变区和轻链可变区，所述轻链可变区含有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，和所述重链可变区含有氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

5) 所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

本公开所述药物组合物已具有足够成药稳定性，可以长期稳定放置。本公开的药物组合物至少具有稳定性好，冻干形态好等优势。

在一些实施方案中，所述药物组合物于 2-8℃ 稳定至少 3 个月，至少 6 个月，至少 12 个月，至少 18 个月或至少 24 个月。在一些实施方案中，所述药物组合物于 25℃ 稳定至少 3 个月，至少 6 个月，至少 12 个月，至少 18 个月或至少 24 个月。在一些实施方案中，所述药物组合物于 40℃ 稳定至少 7 天，至少 14 天或至少 28 天。

在一些实施方案中，所述药物组合物于 200rpm、室温下震荡至少 12h 小时、至少 24 小时、至少 36 小时、至少 48 小时、或者至少 60 小时后仍保持稳定。

在一些实施方案中，所述药物组合物于 -35℃/室温下冻融至少 1 次、至少 2 次、至少 3 次、至少 4 次、至少 5 次、至少 6 次后仍保持稳定。

在一些实施方案中，所述药物组合物于 5000Lx、25℃ 下光照至少 1 天、至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天、至少 6 天、至少 7 天、至少 8 天、至少 9 天、至少 10 天、至少 11 天、至少 12 天后仍保持稳定。

本公开还提供了制备前述药物组合物的方法，包括将抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段原液经缓冲剂置换的步骤，其中所述的缓冲剂可以为醋酸-醋酸钠缓冲剂。

一些实施方案中，前述药物组合物为液体制剂。另一些实施方案中，前述药物组合物为冻干制剂。

本公开还提供一种制备含有抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的方法，其中包括将前述药物组合物经冷冻干燥的步骤。在可选的实施方案中，所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

本公开还提供一种含有抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂，其是经前

述制备冻干制剂的方法制备获得的。

本公开还提供制备含有抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂的复溶溶液的方法，其中包括将前述冻干制剂经复溶的步骤，其复溶所用溶液选自但不限于注射用水、生理盐水或葡萄糖溶液。

- 5 本公开还提供一种含抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的复溶溶液，其是经前述制备复溶溶液的方法制备获得的。

- 本公开提供一种制品、产品或试剂盒，其含有前述本公开任意的含抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的药物组合物、液体制剂、冻干制剂、复溶溶液。可选地，还含有一个或多个容器，所述容器中装有任意前述本公开的药物组合物、液体制剂、冻干制剂、
10 复溶溶液的容器。在一些实施方案中，所述容器为玻璃瓶，例如，为中性硼硅玻璃管制注射剂瓶。

本公开还提供一种制品，其包括容器，该容器中装有前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液。

- 本公开还提供药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液，其用于治疗 and 预防疾病或病症的方法中。
15

本公开还提供前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液在制备用于治疗 and/或预防疾病或病症的药物中的用途。

- 本公开还提供一种治疗和/或预防疾病或病症的方法，包括给予有需要的受试者治疗和/或预防有效量的前述的药物组合物或冻干制剂或冻干制剂的复溶溶液。一些实施方案
20 中，所述受试者为人类受试者。

在一些实施方案中，所述的疾病或病症为与 ANGPTL3 活性有关的任何疾病或病症，包括由 ANGPTL3 介导的疾病或病症。

- 在一些实施方案中，所述的疾病或病症的实例包括但不限于涉及脂质代谢的疾病或病症，例如高脂血症、高脂蛋白血症和血脂异常。在一些实施方案中，所述的疾病或病症的实例包括但不限于动脉粥样硬化性血脂异常、糖尿病性血脂异常、高甘油三酸酯血症(包括严重的甘油三酸酯血症，TG>1000 mg/dL)、高胆固醇血症、乳糜微粒血症、混合血脂异常(例如肥胖、代谢综合征、糖尿病等)、脂肪营养不良、脂肪萎缩等。在一些实施方案中，所述的疾病或病症的实例可以是由 LPL 活性降低、LPL 缺乏、LDL 受体(LDLR)活性降低、LDL 受体缺乏症(例如，LDLR^{-/-}纯合子家族性高胆固醇血症)、改变的
25 ApoC2/ApoE 缺乏、ApoB 增加、极低密度脂蛋白(VLDL)的产生和/或消除减少、某些药物治疗(例如糖皮质激素治疗引起的血脂异常)、任何遗传易感性、饮食、生活方式等导致的血脂异常。

- 在一些实施方案中，所述的疾病或病症可以是与高脂血症、高脂蛋白血症和/或血脂异常相关或由其引起的疾病或病症，其包括但不限于心血管疾病或病症，例如动脉粥样硬化、动脉瘤、高血压、心绞痛、中风、脑血管疾病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、
35 心肌梗塞、周围血管疾病等；急性胰腺炎；非酒精性脂肪性肝炎(NASH)；血糖异常，例

如糖尿病、肥胖等。

在一些实施方案中，所述的疾病或病症的其他实例包括癌症/肿瘤以及与非肿瘤性血管生成相关的疾病或病症。在可选的实施方案中，所述疾病或病症可以是眼血管生成相关疾病或病症，如年龄相关性黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞或视网膜分支静脉阻塞、
5 糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病等。在可选的实施方案中，所述疾病或病症可以是炎性疾病或病症，例如关节炎、类风湿性关节炎(RA)、牛皮癣等。

附图说明

- 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;
10 图2: 抗ANGPTL3抗体对HFD(High-fat-diet, 高脂饮食)小鼠血浆甘油三酯的影响;
图3: 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;
图4: 抗ANGPTL3抗体对HFD小鼠血浆总胆固醇的影响;
图5: 抗ANGPTL3抗体对APOE小鼠(载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)基因敲除小
15 鼠)血浆甘油三酯的影响;
图6: 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;
图7: 抗ANGPTL3抗体在小鼠体内药代动力学实验结果;
图8: 抗ANGPTL3抗体在食蟹猴体内的药代动力学实验结果。

20

具体实施方式

一、术语

为了更容易理解本公开，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公开所属领域的一般技术人员
25 通常理解的含义。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

30 “组氨酸盐缓冲剂”是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸盐，组氨酸-醋酸盐，组氨酸-磷酸盐，组氨酸-硫酸盐等缓冲剂，例如组氨酸-醋酸盐缓冲剂或组氨酸-盐酸盐缓冲剂，组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋酸配制而成，组氨酸盐缓冲剂是组氨酸与盐酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸

枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。枸橼酸盐缓冲剂可以是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。琥珀酸盐缓冲剂可以是琥珀酸-琥珀酸钠。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸二氢钠-磷酸二氢钾、磷酸二氢钠-枸橼酸等。磷酸盐缓冲剂可以是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸-醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。醋酸盐缓冲剂可以是醋酸-醋酸钠。

“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。本文中，“药物组合物”和“制剂”可以互换使用。

本公开中所述药物组合物的溶液形式，若无特殊说明，其中的溶剂均为水。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或溶液制剂经过真空冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

本文所用术语“约”或“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内，所述数值部分取决于怎样测量或测定(即测量体系的限度)。例如，在本领域每一次实行中“约”可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者，“约”或“基本上包含”可意味着至多±20%的范围，例如，约 5.5 的 pH 意指 $\text{pH}5.5 \pm 1.1$ 。此外，特别对于生物学系统或过程而言，该术语可意味着至多一个数量级或数值的至多 5 倍。除非另外说明，否则当具体值在本申请和权利要求中出现时，“约”或“基本上包含”的含义应该假定为在该具体值的可接受误差范围内。

本公开所述的药物组合物能够达到一种稳定的效果：其中的抗体在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性，例如药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

稳定的药物抗体制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在冷藏温度(2-8℃)保存至少 3 个月、至少 6 个月、至少 1 年、最长达 2 年。另外，稳定的液体制剂包括这样的液体制剂：其在包括 25℃保存包括 1 个月、3 个月、6 个月或在 40℃保存 1 个月在内的时段后表现出期望的特征。稳定性的典型的可接受的标准如下：通过 SEC-HPLC 测得，通常不超过约 10%、例如不超过约 5%的抗体单体发生降解。通过视觉分析，药物抗体制剂是无色的，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓

度具有不超过 $\pm 10\%$ 变化。通常观察到不超过约 10%、例如不超过约 5%的截短，通常形成不超过约 10%、例如不超过约 5%的聚集。

如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法(SEC)和动态光散射(DLS)测得，抗体没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法(其确定蛋白三级结构)和通过 FTIR 光谱法(其确定蛋白二级结构)来评价。

如果抗体没有显示出显著的化学改变，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短(通过诸如尺寸排阻色谱法和 SDS-PAGE 等方法来评价)、氧化(通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价)、脱酰胺作用(通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价)和异构化(通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价)。

如果抗体在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述抗体在药物制剂中“保留它的生物活性”。抗体的生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

本公开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。

本公开所述的“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。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，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 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 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 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

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(LCVR)和重链可变区(HCVR)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。本公开所述的抗体或抗原结合片段的 LCVR 区和 HCVR 区的 CDR 氨基酸残基在数量和位置符合已知的 Kabat 编号规则(LCDR1-3, HCDR2-3)，或者符合 kabat 和 chothia 的编号规则(HCDR1)。

本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，例如人源化抗体。

术语“鼠源抗体”在本公开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。在本公开一个可选的实施方案中，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 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将异源(例如,鼠源)性抗体的可变区与抗体(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。在本公开一个可选的实施方案中,所述的抗 ANGPTL3 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 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,例如包含人源 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。

术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将异源(例如,鼠源)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(在因特网 www.mrcpe.com.ac.uk/vbase 可获得),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。本公开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。

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。其中一个可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。本公开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。

本公开“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。

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进行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，从而使得其能够产生为其中 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)Science242 :423-426；和 Huston 等人 (1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85: 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。

本公开中所述的突变序列中的“突变”包括但不限于“回复突变”、“保守修饰”或“保守置换或取代”。本公开中所述的“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。

本公开所述的“突变序列”是指对本公开的核苷酸序列和/或氨基酸序列进行适当的替换、插入或缺失等突变修饰情况下，得到的与本公开的核苷酸序列和/或氨基酸序列具有不同百分比序列同一性程度的核苷酸序列和/或氨基酸序列。本公开中所述的序列同一性可以至少为 85%、90%或 95%，例如至少为 95%。非限制性实施例包括 85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，100%。两个序列之间的序列比较和同一性百分比测定可以通过 National Center For Biotechnology Institute 网站上可得的 BLASTN/BLASTP 算法的默认设置来进行。

“序列同一性”或“序列同源性”当用于氨基酸序列时，是指两个蛋白或多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同氨基酸残基占据时，例如如果两个多肽的一个位置都被同一个氨基酸残基占据时，那么所述分子在该位置是一致的。适于确定序列同一性百分比和序列相似性百分比的算法的实例是 BLAST 和 BLAST2.0 算法，它们分别描述于 Altschul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:403-410 和 Altschul et al.(1977)Nucleic Acids Res.25:3389-3402。用于执行 BLAST 分析的软件可在美国国家生物技术信息中心公开获取(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

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。本公开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 <http://imgt.cines.fr> 得到, 或者从免疫球蛋白杂志, 2001ISBN012441351 上获得。

本公开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 CD40 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。

“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。“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。“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。

“治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂, 例如包含本公开的任一种结合化合物的组合物, 所述受试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, 在治疗受试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可测量的程度。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, 例如受试者的疾病状态、年龄和体重, 以及药物在受试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。尽管本公开的实施方案(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受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化: 例如, 待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“Tm 值”是指蛋白质热变性温度, 即一半蛋白去折叠时的温度, 此时蛋白的空间结构被破坏, 所以 Tm 值越高, 蛋白热稳定性越高。

实施例

以下结合实施例进一步描述本公开，但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1、ANGPTL3 抗原设计及表达

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。

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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQLG
HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKN
EEVKNMSLELNSKLESLLKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKLT
FVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAP
RTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGS
PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIEL
EDWKDNKHYIEYSFYLGNETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG
HFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLY
SIKSTKMLIHPTDSESEFEHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 1

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。

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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQLG
HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKN
EEVKNMSLELNSKLESLLKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKLT
FVEKGSSDYKDDDDKHHHHHH

SEQ ID NO: 2

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。

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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDDVKILANGLLQLG
HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKN
EEVKNMSLELNSKLESLLSEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT
5 **FVEKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL**MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV
QISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
PVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 3

10 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。

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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPEPKSRFAMLDDDVKILANGLLQLG
15 HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKN
EEVKNMSLELNSKLESLLSEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT
FVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPEPR
GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL**MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDV**QISWVFN
NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGS
20 VRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT**EPVLDSDGS**
YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 4

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。

25 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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLSSFDSAPSEPKSRFAMLD**DDVKILANGLLQLG**
HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKN
EEVKNMSVELNSKLESLLSEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAEHPEVTSLSKS
30 **FVEQQDNSIRELLQSV**EEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPSNSLSSKSRA
PRTTPPLQLNETENTEQDDLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQS
GSPWTLIQHRKDGSDQDFNETWENYEKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVQQSNYILRL
ELQDWKDSKHVEYSFHLGSSETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHR
AKGQLYCPESYSGGWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGYWRPQSRK
35 **LYAIKSSKMMLQPTTHHHHHHHHHH**

SEQ ID NO: 5

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。

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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLSSFDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLG
HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKN
5 **EEVKNMSVELNSKLESLEEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAQEHPEVTSLSKS**
FVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPSNSLSSKSEP
RGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWV
NNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK
GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCTMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
10 *GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*

SEQ ID NO: 6

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。

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：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSVSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLG
HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVKN
EEVKNMSLELNSKLESLEEKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPATPEHPEVTSLSKS
FVEKQDNSIKDLLQTVEEQYKQLNQQHSQIKEIENQLRMTNIQEPTISLSKPR
20 **PRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPADCTTIYNRGEHISGTYAIRPSNSQVFHVYCDVVS**
SPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLR
IELEDWKDNKHIEYSFYLGNHETNYTLHVVKITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKA
KGHFSCPESYSGGWWWHDECENNLNGKYNKPRTKSKPERRRGLSWKSQNGR
LYSIKSTKMLIHPTDSESFHHHHHHHHHH

25

SEQ ID NO: 7

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。

8、大鼠全长ANGPTL3：大鼠ANGPTL3(17-455)-His，用于检测，其氨基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLSPFDSVPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLG
30 **HGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQCFYDLSLQTNEIKEEEKELRRTTSKLQVK**
NEEVKNMSLELNSKLESLEEKMALQHRVRALEEQLTSLVQNPPGAREHPEVTS
LKSFVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQQHIIQIKEIENQLRKTGIQEPTENSLYSKPR
APRTTPPLHLKEAKNIEQDDLPAIDCSAIYNRGEHTSGVYTIRPSSSQVFNVYCDTQ
SGTPRTLQHRKDGSQNFNQTWENYEKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVKQSNYILR
35 **LELQDWKDSKHAEYSFHLGNHETNYTLHVAEIAANIPEALPEHRDLMFSTWDH**
RAKGQLYCPSYSGGWWFSDMCGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGISWRPRGG
KLYSIKSSKMMLQPTTHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO: 8

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

实施例2、ANGPTL3抗原蛋白、杂交瘤抗体、重组抗体的纯化

5 2.1 带 His 标签的重组蛋白或带 Flag-his 标签的重组蛋白的纯化

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 10 溶液洗脱目的蛋白，并收集洗脱峰。

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。

2.2 杂交瘤抗体或带 mFc 标签的重组蛋白的纯化

15 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 20 mFc 标签的重组蛋白或杂交瘤抗体。

2.3 抗体、带 Fc 标签的重组蛋白的纯化

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 25 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。

实施例3、抗ANGPTL3抗体的制备

30 3.1 通过噬菌体库筛选抗ANGPTL3人源抗体

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2 35 μg/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。

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 P8 对应的氨基酸序列如下：

>P8 重链可变区序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPRDDSTSY
AQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVWGQGIT
VTVSS

SEQ ID NO: 9

>P8 轻链可变区序列：

DVVMVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 10

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。

3.2 抗 ANGPTL3 抗体的突变

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：

>P8B 重链可变区序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPREDSTSY
AQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVWGQGIT
VTVSS

SEQ ID NO: 17

>P8B 轻链可变区序列：

DVVMVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 18

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。

表 1. P8B 抗体分子的 CDR 序列

轻链 CDR		重链 CDR	
LCDR1	RSSQSLHSHNVYTYLD (SEQ ID NO: 11)	HCDR1	SYDIN (SEQ ID NO: 14)
LCDR2	LGSNRAS (SEQ ID NO: 12)	HCDR2	LINPREDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO: 15)
LCDR3	MQALQTPLT (SEQ ID NO: 13)	HCDR3	DLGSIREVLYYGMDV (SEQ ID NO: 16)

3.3 抗 ANGPTL3 抗体的构建和表达

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: 19 所示的人 IgG4-YTE 变体，轻链恒定区选自序列如 SEQ ID NO: 20 所示的人 κ 链的恒定区。

>人 IgG4-YTE 变体重链恒定区序列：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 19

>人 κ 链轻链恒定区序列：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

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

>P8BG 重链序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPREDSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVWGQGIT
 VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 21

>P8BG 轻链序列：

DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTIFGQGTREIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO: 22

实施例4、抗ANGPTL3抗体的体外评价

4.1 抗ANGPTL3抗体结合ANGPTL3蛋白的ELISA实验

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。

- 10 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
- 15 的强弱判断抗体和 ANGPTL3 的结合活性。

- 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 250μL/孔, 37℃ 孵育箱孵育 3 小时或 4℃ 放置过夜(16-18
- 20 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 50μL/孔用样品稀释液(pH7.4PBS 含 1%BSA)稀释至 0.5μg/mL 人 ANGPTL3(17-170)-mFc(序列如 SEQ ID NO: 3)置 37℃ 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 50μL/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体,放于 37℃ 孵育箱孵育 2 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次,加入 50μL/
- 25 孔用样品稀释液稀释的羊抗人二抗(Jackson Immuno Research, 109-035-003), 37℃ 孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后,加入 50μL/孔 TMB 显色底物(KPL, 52-00-03),于室温孵育 2-5 分钟(min),加入 50μL/孔 MH_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 EC_{50} 值。实验结果见表 3。

- 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
- 30 3μg/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 250μL/孔, 37℃ 孵育箱孵育 3 小时或 4℃ 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(pH7.4 PBS 含 0.05%吐温-20)洗板 3 次后,加入 50μL/孔用样品稀释液(pH7.4PBS 含 1%BSA)稀释至 0.5μg/mL 的生物素标记的小鼠 ANGPTL3(17-455)-His(序列如 SEQ ID NO: 5)、食蟹猴
- 35 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℃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 50μL/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 放于 37℃孵育箱孵育 2 小时。孵育结束后用 PBST 洗板 3 次, 加入 50μL/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℃孵育 1 小时。用 PBST 洗板 3 次后, 加入 50μL/孔 TMB 显色底物(KPL, 52-00-03), 于室温孵育 2-5 分钟(min), 加入 50μL/孔 MH_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 EC_{50} 值。实验结果见表 2, 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。

表 2. 抗 ANGPTL3 抗体与不同种属 ANGPTL3 蛋白结合 ELISA 实验

抗体	与人 ANGPTL3 结合 $\text{EC}_{50}(\text{nM})$	与小鼠 ANGPTL3 结合 $\text{EC}_{50}(\text{nM})$	与食蟹猴 ANGPTL3 结合 $\text{EC}_{50}(\text{nM})$	与大鼠 ANGPTL3 结合 $\text{EC}_{50}(\text{nM})$
P8G	0.361	1.732	2.528	2.115
P8BG	0.172	0.105	0.200	0.528

4.2 抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3抗原蛋白的HTRF结合实验

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。

用 稀 释 液 (pH7.4 PBS 含 1%BSA) 配 置 4 μg/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), 5μL/孔加入到 384 孔板中 (PerkinElmer, optiplate-384), 然后加入 5 μL/孔的 HTRF 试剂 Streptavidin-Tb cryptata 以及 Pab 抗鼠 IgG-XL665 的混合液, 最后加入 10 μL/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 放在 25℃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 EC_{50} 值。实验结果见表 3, 实验结果表明, 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。

表 3. 抗 ANGPTL3 抗体与 ANGPTL3 蛋白的 HTRF 结合实验

抗体	与 ANGPTL3 蛋白结合的 EC ₅₀ (nM)			
	人 ANGPTL3	小鼠 ANGPTL3	食蟹猴 ANGPTL3	大鼠 ANGPTL3
P8G	0.784	0.450	0.303	0.484
P8BG	0.277	0.321	0.360	0.362

4.3 抗ANGPTL3抗体抑制LPL 的酶活实验

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。

5 用稀释缓冲液(pH7.4 PBS+2 mg/mL BSA)稀释牛 LPL(Sigma, L2254-5KU)到 12.5 单位, 25 μL/孔加入到 96 孔板中(Corning, 3603), 然后加入 25μL/孔用样品稀释液稀释的不同浓度待测抗体, 再加入 25μL/孔浓度为 27.6μg/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℃培养箱中孵育 30min。最后加入 25μL/孔用稀释缓冲液稀释的 20μM 的底物(Sigma, 30058-10MG-F), 将 96 孔板在振荡器上振荡混匀, 37℃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 4, 实施结果表明, 本披露的抗体具有良好的 LPL 酶抑制作用。

15 表 4. 抗 ANGPTL3 抗体阻断不同种属 ANGPTL3 抑制 LPL 的活性实验结果

抗体	IC ₅₀ (nM)			
	人 ANGPTL3	小鼠 ANGPTL3	Cyno ANGPTL3	大鼠 ANGPTL3
P8BG	75.3	41.5	53.6	132.2

4.4 抗ANGPTL3抗体与ANGPTL3 蛋白的Biacore检测实验

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:

20 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。

25 在每个循环解离完成后, 使用 pH 1.5 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, 得出亲和力数值。实验结果见表 5, 实验结果表明, 本披露的抗 ANGPTL3 抗体能与、食蟹猴、大鼠及小鼠的 ANGPTL3 抗原以高亲和力结合。

表 5. 抗 ANGPTL3 抗体与 ANGPTL3 蛋白的 Biacore 检测实验结果

抗体	抗原	结合常数 (1/Ms)	解离常数 (1/s)	亲和力 (M)
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

实施例5、抗ANGPTL3抗体大鼠体内药效评价

5.1 P8BG抗体在大鼠体内降脂实验

5 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, 100 g 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, 3500 RPM 离心 15 min, 取血清。利用 ADVIA 2400 化学系统(Siemens)测定血清脂质浓度

10 (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 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SEM),

15 并 Graphpad Prism5 软件作图, 采用 TTEST 进行统计学分析。

实验结果见图 1 及表 6 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 Evinacumab3.5 mpk 组, 其余各组均有统计差异, 实验过程中, P8BG 7 mpk 组的甘油三酯最大下降 83.7%, P8BG 3.5 mpk 组甘油三酯最大下降 81.8%, P8BG 1.75 mpk 组甘油三酯最大下降 68.7%; 给药 5 天后, P8BG 3.5mpk 组、P8BG 1.75mpk 组、P8BG 7mpk 组组甘油三酯下降仍有统计差异, 而 Evinacumab 3.5mpk 组、Evinacumab 7mpk 组无统计差异; 给药 9 天后, P8BG 7 mpk 组和 P8BG 3.5 mpk 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。

表 6. P8BG 抗体对大鼠血清甘油三酯的影响

抗体	Evinacumab		P8BG		
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%

(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.)

5.2 在高脂高胆固醇喂养c57bl/6小鼠中测定抗ANGPTL3抗体对血浆脂质浓度的体内效应

c57bl/6 小鼠按 5 只/笼饲养(4 周龄 c57bl/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±1℃，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。

实验结果见表 7 至表 9 和图 2-4 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 25 mpk 组的 TG、TC 及 LDL-C 均显著下降；Evinacumab25 mpk 及 P8BG5 mpk 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 P8BG25 mpk 和 P8BG5 mpk 两组甘油三酯显著下降。与 Evinacumab25 mpk 组相比，实验第 2 周，第 3 周，第 9 周，P8BG25 mpk 组的甘油三酯及总胆固醇均显著下降；与 Evinacumab25 mpk 组相比，实验第 2 周、第 9 周，P8BG25 mpk 组的 LDL-C 显著下降。在第一至第 11 周的整个实验周期中，Evinacumab25 mpk 组 TG 最低降至 40.5±2.3，与开始 TG 相比下降了 32.60%；而 P8BG25 mpk 组 TG 最低降至 21.1±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。

表 7.抗 ANGPTL3 抗体对 c57bl/6 小鼠血浆 TG 的影响

抗体	Evinacumab	P8BG		hIgG
皮下每周给药剂量	25mpk	25mpk	5mpk	25mpk

开始 TG(mg/dL)	60.1±3.2	60.1±4.1	60.1±3.8	60.0±6.2
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%

(注：max Inh %表示相对于开始 TG 的最大降脂百分比)

表 8.抗 ANGPTL3 抗体对 c57bl/6 小鼠血浆 LDL 的影响

抗体	Evinacumab	P8BG	
皮下每周给药剂量	25mpk	25mpk	5mpk
Max Inh %	28.10%	52.10%	42.80%

(注：Max Inh %表示相对于阴性对照组 LDL 的最大降脂百分比)

表 9.抗 ANGPTL3 抗体对 c57bl/6 小鼠血浆 TC 的影响

抗体	Evinacumab	P8BG	
皮下每周给药剂量	25mpk	25mpk	5mpk
Max Inh %	27.50%	47.90%	36.20%

(注：Max Inh %表示相对于阴性对照组 TC 的最大降脂百分比)

5.3 在APOE小鼠中测定抗ANGPTL3抗体对血浆脂质浓度的体内效应

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±1℃, 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 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 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 6), 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。

本次实验结果见图 5、6 和表 10 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±5.4mg/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±3.3mg/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±2.2mg/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±1.7mg/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。

表 10. 抗 ANGPTL3 抗体对 APOE 小鼠血浆甘油三酯的影响

抗体	Evinacumab		P8BG		hIgG
皮下给药剂量	10 mpk	5 mpk	10 mpk	5 mpk	10 mpk
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%

(注： max Inh %表示相对于开始 TG 的最大降脂百分比)

实施例6、抗ANGPTL3抗体药代动力学评价

5 6.1 抗ANGPTL3抗体小鼠体内药代动力学实验

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 10 mg/kg；注射体积均为 5 mL/kg。

10 给药组于给药前及给药后5min、8h、1 d、2 d、4 d、7 d、10d、14 d、21 d、28d采集全血0.1 mL，不加抗凝，取血后在4℃放置30min，1000g离心15 min，取上清(血清)置于EP管中，于-80℃保存。

15 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11和图7。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。

表 11. 抗 ANGPTL3 抗体在小鼠药代动力学

抗体	P8BG	Evinacumab
给药方式	i.v.	i.v.
给药剂量(mg/kg)	10	10
t _{1/2} (h)	131.4±18.8	71.1±6.1
t _{1/2} (d)	5.47±0.78	2.96±0.25
AUC _{0-∞} (h*ug/mL)	23272±2887	16904±4481

(注： AUC_{0-∞}：药时曲线下面积； t_{1/2}(h)：半衰期(以小时为单位)； t_{1/2}(d)：半衰期(以天为单位)； i.v.静脉内注射。)

20 6.2 抗ANGPTL3抗体在食蟹猴体内的药代动力学评价

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 10 mg/kg；注射体积均为 2 mL/kg。

分组后动物禁食过夜，分别于给药前、给药开始后 1 小时(h)、2 h、4 h、8 h、12 h、1 天(d)、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d、21d、28 d、35 d、42 d、49 d和 56 d于下肢静脉取血 2 mL左右，置含分离胶的采血管中，取血后于室温放置 30 分钟(min)，1000 g离心 15 min，
5 取上清分装于 2 个干净的EP管中，-70℃以下暂存(采血后 2 h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 12 和图 8。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。

表 12. 抗 ANGPTL3 抗体在食蟹猴药代动力学

	P8BG	Evinacumab
给药剂量 (mg/kg)	10	10
给药方式	sc.	sc.
t _{1/2} (h)	324.7±115.3	157.7±28.6
t _{1/2} (d)	13.5±4.8	6.6±1.2
AUC 0-∞ (ug/mL*h)	44243±7404	38027±252

10 (注：AUC 0-∞：药时曲线下面积；t_{1/2}(h)：半衰期(以小时为单位)；t_{1/2}(d)：半衰期(以天为单位)；sc.皮下注射。)

实施例 7、示例性抗体药物组合物(制剂)制备工艺

第一步：抗 ANGPTL3 抗体与稳定剂配制成含抗 ANGPTL3 抗体的制剂原液，经过
15 滤后中控取样检测无菌。将原液过 0.22μm PVDF 滤芯，收集滤液。

第二步：调节装量进行灌装(灌装量和包材待定)，加塞，分别于灌装开始、灌装中间、灌装结束时取样中控检测装量差异。

第三步：开启轧盖机，加铝盖，进行轧盖。

第四步：目检，确认产品无装量不准等缺陷。打印、粘贴西林瓶标签；打印纸盒标
20 签，折叠纸盒，装盒，贴纸盒标签。

实施例 7-13 中所用的抗 ANGPTL3 抗体是 P8BG 抗体，其重链序列如 SEQ ID NO：
21 所示，轻链序列如 SEQ ID NO：22 所示。

实施例 8、抗 ANGPTL3 抗体制剂 pH 值的筛选

25 配制下列缓冲液，制备抗 ANGPTL3 抗体浓度为 1.0mg/mL 的抗体制剂，通过测定样品的熔解温度(Tm)、热分解起始温度(Tonset)，考察抗 ANGPTL3 抗体在不同 pH 条件下的热稳定性，通过测定样品的聚集温度(Tagg)及粒径(Radius)，考察抗 ANGPTL3 抗体在不同 pH 条件下的胶体稳定性。

- 1) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠，pH 4.2
- 30 2) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠，pH 4.6

- 3) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 5.0
- 4) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 5.4
- 5) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 5.8
- 6) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 6.2
- 5 7) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 6.6
- 8) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 7.0
- 9) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 7.4
- 10) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 7.8
- 11) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 8.2
- 10 12) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠, pH 8.6

表 13. 抗 ANGPTL3 抗体 pH 值筛选结果

序号	理论 pH	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)	粒径 (nm)	%PD
1)	4.2	51.8	67.5	59.6	68.6	68.9	6.0	12.7
2)	4.6	54.4	68.9	61.8	68.2	68.5	5.8	11.4
3)	5.0	55.4	68.4	64.1	67.6	68.0	6.1	17.7
4)	5.4	58.0	67.8	62.9	66.5	67.2	6.0	16.0
5)	5.8	59.1	67.3	60.9	65.5	66.4	5.4	2.7
6)	6.2	60.1	66.3	61.6	63.5	65.3	5.4	0.1
7)	6.6	65.3	N/A	59.7	64.8	65.3	5.4	3.1
8)	7.0	63.9	N/A	58.6	64.9	65.3	6.1	21.5
9)	7.4	62.8	N/A	58.4	64.2	64.7	6.2	24.1
10)	7.8	62.3	N/A	57.4	62.9	62.9	6.1	20.6
11)	8.2	62.0	N/A	57.5	62.5	63.5	6.2	22.4
12)	8.6	61.8	N/A	57.5	61.0	N/A	6.5	27.9

(注: %PD 表示分散系数, 值越小, 表明粒径分布越均一; N/A 表示不适用)

结果显示: 抗 ANGPTL3 抗体在 pH 值为 5.0±0.4 条件下, Tagg 和 Tonset 值较高;

在 pH 值为 6.2±0.4 条件下, 粒径较小, 分布更均一, 且 Tm1 值较高, 表明该抗体在 pH

15 值为 5.0±0.4 和 6.2±0.4 条件下热稳定性和胶体稳定性较好。

实施例 9、抗 ANGPTL3 抗体制剂缓冲体系的筛选和确认

9.1 pH 6.0 缓冲体系筛选

选择 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0、10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0 的缓

20 冲体系, 制备含 50 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体的制剂, 取样品进行高温(40°C)和室温(25°C)

稳定性研究:

- 1) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0
- 2) 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0

表 14. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.0)筛选稳定性结果 1

缓冲体系	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset(°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
------	-------------	-------------	----------------	------------------	------------------

10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0	57.5	67.2	58.4	64.1	65.4
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0	54.4	69.0	58.3	67.9	67.6

(注：此表为抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.0)筛选 0 时样品稳定性结果)

表 15. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.0)筛选稳定性结果 2

缓冲体系	考察条件	外观	粒径(nm)	%PD
10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0	0 时	无色，显著乳光，大量白色颗粒	7.1	4.3
	25℃-1W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	7.1	6.3
	25℃-2W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.1	5.2
	25℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.2	6.3
	40℃-1W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.3	8.8
	40℃-2W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.5	13.2
	40℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.9	17.5
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0	0 时	无色，显著乳光，大量白色颗粒	6.3	3.1
	25℃-1W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	6.8	4.9
	25℃-2W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	6.7	6.3
	25℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	6.7	4.4
	40℃-1W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	6.7	5.1
	40℃-2W	无色，显著乳光，大量白色纤维	6.8	5.7
	40℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.0	10.6

(注：1W 表示 1 周；粒径反映胶体稳定性；%PD 表示分散系数)

表 16. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.0)筛选稳定性结果 3

缓冲体系	考察条件	SEC		iCIEF		
		聚体%	单体%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%
10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0	0 时	5.1	94.9	15.3	43.4	41.3
	25℃-1W	5.1	94.9	15.5	44.2	40.4
	25℃-2W	5.1	94.9	16.6	43.2	40.3
	25℃-4W	5.2	94.8	17.1	45.0	38.0
	40℃-1W	5.6	94.4	16.9	44.7	38.4
	40℃-2W	6.0	93.5	20.1	42.8	37.1
	40℃-4W	7.1	92.2	27.6	35.5	36.9
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0	0 时	4.6	95.4	14.9	43.9	41.2
	25℃-1W	4.5	95.5	15.9	44.8	39.4
	25℃-2W	4.5	95.5	16.3	45.2	38.6
	25℃-4W	4.6	95.4	16.6	48.3	35.1

	40℃-1W	5.0	95.0	16.7	44.9	38.4
	40℃-2W	5.3	94.2	18.5	43.7	37.8
	40℃-4W	6.1	93.2	25.7	35.6	38.7

(注：1W 表示 1 周)

结果显示：相同考察条件下，相比于 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.0 缓冲体系，抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0 缓冲体系 Tagg 值更高，粒径更小，聚体含量更低，表明抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.0 缓冲体系稳定性更好。

9.2 pH6.6 缓冲体系的筛选

选择 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.6、10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6 的缓冲体系，制备含 50mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体的制剂，取样品进行高温(40℃)和室温(25℃)稳定性研究：

- 10
- 1) 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.6

2) 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6

表 17. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.6)筛选稳定性结果 1

缓冲体系	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset(°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.6	59.5	66.2	59.2	63.2	64.7
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6	59.0	67.0	55.8	65.5	65.3

(注：此表为抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.6)筛选 0 时样品稳定性结果)

表 18. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.6)筛选稳定性结果 2

缓冲体系	考察条件	外观	粒径 (nm)	%PD
10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.6	0 时	无色，显著乳光，大量白色颗粒	6.8	6.8
	25℃-1W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	6.8	5.2
	25℃-2W	无色，显著乳光，大量白色纤维	6.7	7.1
	25℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	6.8	6.1
	40℃-1W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.0	10.0
	40℃-2W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.1	13.6
	40℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	7.7	20.7
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6	0 时	无色，显著乳光，大量白色颗粒	7.8	3.4
	25℃-1W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	8.0	4.1
	25℃-2W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	7.8	3.8
	25℃-4W	无色，显著乳光，大量白色颗粒	7.4	10.8

	40℃-1W	无色，显著乳光，大量白色纤维	8.2	7.7
	40℃-2W	无色，显著乳光，大量白色纤维	8.1	6.5
	40℃-4W	无色，显著乳光，大量白色纤维	6.8	18.5

(注：1W 表示 1 周；粒径反映胶体稳定性；%PD 表示分散系数)

表 19. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 6.6)筛选稳定性结果 3

缓冲体系	考察条件	SEC		iCIEF		
		聚体%	单体%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%
10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.6	0 时	4.7	95.3	15.5	43.9	40.6
	25℃-1W	4.7	95.3	16.6	43.5	39.9
	25℃-2W	4.6	95.4	16.5	43.4	40.1
	25℃-4W	4.8	95.2	17.1	44.2	38.7
	40℃-1W	5.1	94.8	19.2	43.5	37.4
	40℃-2W	5.6	94.3	22.2	43.1	34.7
	40℃-4W	6.6	92.8	32.5	34.1	33.4
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6	0 时	4.5	95.5	15.2	44.3	40.5
	25℃-1W	4.5	95.5	15.4	44.6	40.0
	25℃-2W	4.4	95.6	16.0	43.7	40.3
	25℃-4W	4.5	95.4	16.2	44.8	38.9
	40℃-1W	4.8	95.1	17.4	43.0	39.6
	40℃-2W	5.1	94.5	20.1	42.9	37.0
	40℃-4W	5.8	93.5	30.3	38.0	31.6

(注：1W 表示 1 周)

结果显示：相同考察条件下，相比于 10mM 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠 pH 6.6 缓冲体系，抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6 缓冲体系 Tonset 值更低，Tagg 值更高，粒径相对更大，但聚体含量相对更低，单体和主峰含量相对更高，综合考虑抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH 6.6 缓冲体系稳定性更好。

9.3 pH4.6 缓冲体系的筛选

选择 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 4.6、10mM 醋酸-醋酸钠 pH 4.6 的缓冲体系，制备含 50 mg/mL 蛋白的抗体制剂，取样品进行高温(40℃)和室温(25℃)稳定性研究：

- 1) 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 4.6
- 2) 10mM 醋酸-醋酸钠 pH 4.6

表 20. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 4.6)筛选稳定性结果 1

缓冲体系	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset(°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
------	----------	----------	------------	---------------	---------------

10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 4.6	63.3	72.2	61.4	N/A	68.2
10mM 醋酸-醋酸钠 pH 4.6	60.5	71.4	65.1	N/A	67.9

(注：此表为抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 4.6)筛选 0 时样品稳定性结果；N/A 表示不适用)

表 21. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 4.6)筛选稳定性结果 2

缓冲体系	考察条件	外观	粒径 (nm)	%PD
10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 4.6	0 时	无色，澄明，大量白色颗粒	3.1	34.9
	25℃-1W	无色，澄明，大量白色颗粒	3.4	48.7
	25℃-2W	无色，澄明，少量白色颗粒	3.2	26.2
	25℃-4W	无色，澄明，微量白色颗粒	3.3	35.6
	40℃-1W	无色，澄明，少量白色颗粒	4.1	N/A
	40℃-2W	无色，轻微乳光，少量白色颗粒	4.5	N/A
	40℃-4W	无色，澄明，微量白色颗粒	5.1	N/A
10mM 醋酸-醋酸钠 pH 4.6	0 时	无色，澄明，大量白色颗粒	2.7	23.1
	25℃-1W	无色，澄明，大量白色颗粒	2.7	21.4
	25℃-2W	无色，澄明，极少量白色纤维	2.7	17.7
	25℃-4W	无色，澄明，无可见蛋白颗粒	2.7	24.3
	40℃-1W	无色，澄明，微量白色颗粒	3.1	44.1
	40℃-2W	无色，澄明，少量白色颗粒	3.3	51.1
	40℃-4W	无色，澄明，微量白色颗粒	4.0	N/A

(注：1W 表示 1 周；粒径反映胶体稳定性；%PD 表示分散系数；N/A 表示不适用)

5

表 22. 抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系(pH 4.6)筛选稳定性结果 3

缓冲体系	考察条件	SEC		iCIEF		
		聚体%	单体%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%
10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 4.6	0 时	5.0	95.0	15.4	42.7	41.9
	25℃-1W	5.1	94.9	16.1	43.8	40.2
	25℃-2W	5.0	95.0	16.0	43.7	40.3
	25℃-4W	5.2	94.7	17.3	44.1	38.6
	40℃-1W	19.9	79.1	14.4	35.0	50.6
	40℃-2W	29.1	68.9	13.6	29.6	56.8
	40℃-4W	40.7	55.1	13.2	19.6	67.3
10mM 醋酸-醋酸钠 pH 4.6	0 时	4.9	95.1	15.5	43.6	40.9
	25℃-1W	5.0	95.0	16.3	46.3	37.5
	25℃-2W	5.0	95.0	17.1	47.0	35.9
	25℃-4W	5.1	94.8	18.7	49.6	31.7
	40℃-1W	17.4	81.3	12.2	35.0	52.9
	40℃-2W	24.9	72.6	13.5	25.3	61.2
	40℃-4W	35.6	59.4	11.1	18.3	70.5

(注：1W 表示 1 周)

10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 5.0	0 时	4.8	95.2	15.6	43.0	41.5
	25°C -1W	4.8	95.2	15.6	44.4	39.9
	25°C -2W	4.8	95.2	16.1	44.6	39.3
	25°C -4W	4.9	95.0	17.5	44.1	38.4
	40°C -1W	9.9	89.6	16.4	40.6	43.0
	40°C -2W	13.3	86.0	16.0	36.6	47.4
	40°C -4W	21.2	77.3	21.8	27.3	50.8
10mM 醋酸-醋酸钠 pH 5.0	0 时	4.7	95.3	15.2	43.9	41.0
	25°C -1W	4.7	95.3	16.6	47.3	36.2
	25°C -2W	4.7	95.3	18.0	48.4	33.6
	25°C -4W	4.8	95.2	19.5	54.0	26.5
	40°C -1W	7.4	92.1	15.2	42.4	42.4
	40°C -2W	9.4	89.8	14.9	41.3	43.9
	40°C -4W	14.1	84.2	20.3	30.1	49.6

(注：1W 表示 1 周)

结果显示：相同考察条件下，相比于 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH 5.0 缓冲体系，抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 醋酸-醋酸钠 pH 5.0 缓冲体系 Tm₁ 值、Tonset 值、Tagg 值更高，且粒径更小，聚体含量更低，单体和主峰含量更高，表明抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 醋酸-醋酸钠 pH 5.0 缓冲体系稳定性更好。

抗 ANGPTL3 抗体缓冲体系筛选结果显示：抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH4.6、10mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6、10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0 缓冲体系外观较好，且 Tm₁、Tagg 及 Tonset 值较高，但在高温 40°C 条件下，聚体明显增加；在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH6.0 缓冲体系外观较差，Tm₁、Tagg 及 Tonset 值较高，高温条件下，聚体无明显增加。考虑到缓冲体系筛选所用样品为混合样品，为进一步确认最终 pH 和缓冲体系，用单克隆抗体样品进行缓冲体系确认。

9.5 抗 ANGPTL3 抗体制剂缓冲体系的确认

选择 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH6.0、10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH4.6、10mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6、10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0 的缓冲体系，制备含 50mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体的制剂，取样品进行高温 60°C 和 40°C 稳定性研究：

- 1) 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸，pH6.0；
- 2) 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠，pH4.6；
- 3) 10mM 醋酸-醋酸钠，pH4.6；
- 4) 10mM 醋酸-醋酸钠，pH5.0；

表 26. 抗 ANGPTL3 抗体制剂缓冲体系确认结果 1

缓冲体系	考察条件	外观	粒径 (nm)	%PD
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH6.0	0 时	无色, 显著乳光, 大量白色颗粒	9.0	多峰
	60°C-3h	无色, 显著乳光, 无可见颗粒	Imcompleted	
	40°C-4d	无色, 显著乳光, 少量白色颗粒	NT	NT
	40°C-7d	无色, 显著乳光, 大量白色颗粒	7.7	31.7
10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH4.6	0 时	无色, 轻微乳光, 大量白色颗粒	7.2	多峰
	60°C-3h	无色, 轻微乳光, 无可见颗粒	7.2	57.0
	40°C-4d	无色, 轻微乳光, 少量色颗粒	NT	NT
	40°C-7d	无色, 澄明, 大量白色颗粒	5.9	18.0
10mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6	0 时	无色, 澄明, 少量白色颗粒	2.6	41.9
	60°C-3h	无色, 澄明, 无可见颗粒	3.6	多峰
	40°C-4d	无色, 澄明, 无可见颗粒	NT	NT
	40°C-7d	无色, 澄明, 大量白色纤维	3.9	17.7
10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0	0 时	无色, 微乳光, 大量白色颗粒	5.1	25.3
	60°C-3h	无色, 微乳光, 无可见颗粒	8.0	30.5
	40°C-4d	无色, 微乳光, 少量可见纤维	NT	NT
	40°C-7d	无色, 微乳光, 大量白色颗粒	5.1	24.9

(注: h 表示小时; d 表示天; 粒径反映胶体稳定性; %PD 表示分散系数; NT 表示未检测; Imcompleted 表示样品较差, 导致仪器未能成功检测)

表 27. 抗 ANGPTL3 抗体制剂缓冲体系确认结果 2

缓冲体系	考察条件	SEC		iCIEF			结合活性 (%)
		聚体%	单体%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%	
10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH6.0	0 时	5.0	95.0	16.7	71.8	11.5	109
	60°C-3h	28.5	71.5	16.6	50.1	33.3	75
	40°C-4d	5.3	94.7	17.6	69.7	12.7	NT
	40°C-7d	5.3	94.7	18.7	68.9	12.5	81
10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH4.6	0 时	6.9	93.1	15.0	71.5	13.5	107
	60°C-3h	93.8	6.1	6.8	28.2	65.0	65
	40°C-4d	18.0	82.0	17.0	64.4	18.7	NT
	40°C-7d	22.6	77.3	18.2	59.6	22.2	80
10mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6	0 时	7.3	92.7	15.8	71.4	12.8	106
	60°C-3h	88.3	11.7	8.6	34.9	56.5	77

	40°C-4d	9.0	90.9	16.6	68.2	15.2	NT
	40°C-7d	10.2	89.7	18.0	64.8	17.2	90
10mM 醋酸- 醋酸钠 pH5.0	0 时	5.1	94.9	16.2	72.3	11.5	110
	60°C-3h	89.2	10.8	10.0	36.7	53.3	67
	40°C-4d	5.8	94.2	17.0	69.7	13.2	NT
	40°C-7d	6.2	93.8	18.3	68.1	13.6	85

(注：h 表示小时；d 表示天；NT 表示未检测)

结果表明：相比于 10mM 琥珀酸-琥珀酸钠 pH4.6 和 10mM 醋酸-醋酸钠 pH4.6 缓冲体系，抗 ANGPTL3 抗体在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH6.0、10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0 缓冲体系下稳定性更好；而在 10mM 组氨酸-盐酸组氨酸 pH6.0 缓冲体系下，呈显著乳光，且加聚山梨酯 80 后外观无改善。

实施例 10、抗 ANGPTL3 抗体制剂中糖浓度的筛选

选择 10mM 醋酸-醋酸钠 pH5.0 的缓冲体系，制备含不同糖浓度的缓冲体系或抗 ANGPTL3 抗体制剂：

- 10
- 15
- 1) 10mM 醋酸-醋酸钠，pH 5.0；
2) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，60mg/mL 蔗糖，pH5.0；
3) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，70mg/mL 蔗糖，pH5.0；
4) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，75mg/mL 蔗糖，pH5.0；
5) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，80mg/mL 蔗糖，pH5.0；
6) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，90mg/mL 蔗糖，pH5.0；
7) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2mg/mL 聚山梨酯 80，80mg/mL 蔗糖，pH5.0；
以上 1)至 7)中，均含有 100 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体。

各样品渗透压结果见下表：

表 28. 抗 ANGPTL3 抗体不同蔗糖浓度渗透压结果

序号	蔗糖浓度	蛋白浓度	聚山梨酯 80 浓度	渗透压值(mOsm/kg)
1)	0mg/mL	100mg/mL	0mg/mL	28
2)	60mg/mL	0mg/mL	0.2mg/mL	217
3)	70mg/mL	0mg/mL	0.2mg/mL	239
4)	75mg/mL	0mg/mL	0.2mg/mL	257
5)	80mg/mL	0mg/mL	0.2mg/mL	270
6)	90mg/mL	0mg/mL	0.2mg/mL	322
7)	80mg/mL	100mg/mL	0.2mg/mL	317

根据渗透压结果，蔗糖的可用浓度为 60-90mg/mL，例如蔗糖浓度为 75mg/mL，用以制备等渗的抗 ANGPTL3 抗体制剂。

实施例 11、抗 ANGPTL3 抗体制剂中表面活性剂浓度的筛选

5 选择 10mM 醋酸-醋酸钠，制备含 100mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体，75mg/mL 蔗糖，不同浓度聚山梨酯 80 的制剂，并考察震荡、冻融、光照、高温条件下抗体稳定性。

1) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.1 mg/mL 聚山梨酯 80，75mg/mL 蔗糖，抗 ANGPTL3 抗体浓度 100mg/mL，pH 5.0

2) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.4 mg/mL 聚山梨酯 80，75mg/mL 蔗糖，抗 ANGPTL3 抗体
10 浓度 100mg/mL，pH 5.0

表 29. 不同浓度表面活性剂制剂稳定性结果 1

处方组成	放置时间	外观	粒径 (nm)	%PD
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.1 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白， pH5.0	0 时	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.4	27.6
	震荡 48h 200rpm, RT	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.4	25.5
	冻融 3 次 -35°C/RT	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.8	20.0
	冻融 5 次 -35°C/RT	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.5	55.0
	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	5.3	23.7
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.4	27.3
	40°C-1W	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.5	26.7
	40°C-2W	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.6	39.7
	40°C-4W	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.9	多峰
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.4 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白， pH5.0	0 时	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.3	23.9
	震荡 48h 200rpm, RT	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	5.7	52.8
	冻融 3 次 -35°C/RT	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	5.1	44.8
	冻融 5 次 -35°C/RT	无色，轻微乳光， 无可见蛋白颗粒	4.3	23.8

	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	4.4	29.3
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	4.4	24.5
	40°C-1W	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	4.6	34.5
	40°C-2W	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	4.4	25.4
	40°C-4W	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	4.7	34.2

(注: h 表示小时; W 表示周; RT 表示室温; 粒径反映胶体稳定性; %PD 表示分散系数; NT 表示未检测)

表 30. 不同浓度表面活性剂制剂稳定性结果 2

处方组成	放置时间	SEC		iCIEF		
		聚体%	单体%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.1 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白, pH5.0	0 时	2.8	97.2	16.9	78.1	5.0
	震荡 48h 200rpm, RT	2.9	97.1	15.1	79.3	5.5
	冻融 3 次 -35°C/RT	2.8	97.2	15.5	78.8	5.7
	冻融 5 次 -35°C/RT	2.8	97.2	15.3	78.8	5.8
	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	3.2	96.8	17.1	77.3	5.6
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	3.3	96.7	17.1	78.0	4.9
	40°C-1W	3.4	96.6	20.2	72.0	7.8
	40°C-2W	4.1	95.8	22.1	68.9	9.0
	40°C-4W	5.9	93.9	30.4	59.5	10.1
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.4 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白, pH5.0	0 时	2.8	97.2	16.4	78.8	4.8
	震荡 48h 200rpm, RT	2.8	97.2	15.9	77.3	6.8
	冻融 3 次 -35°C/RT	2.8	97.2	15.3	78.9	5.8
	冻融 5 次 -35°C/RT	2.8	97.2	16.1	78.4	5.5

	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	3.1	96.9	17.1	76.7	6.2
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	3.3	96.6	18.0	76.6	5.4
	40°C-1W	3.4	96.6	19.9	73.4	6.7
	40°C-2W	4.2	95.7	21.6	70.7	7.7
	40°C-4W	6.0	93.8	30.2	59.8	10.1

(注：h 表示小时；W 表示周；RT 表示室温)

结果表明：含 0.1mg/mL 或 0.4mg/mL 聚山梨酯 80 的抗 ANGPTL3 抗体制剂，在震荡、冻融、光照、高温条件下，稳定性无明显差异，因此，抗 ANGPTL3 抗体制剂中聚山梨酯 80 可用的浓度范围为 0.1mg/mL~0.4mg/mL。

5

实施例 12、制剂 pH 对稳定性的影响

选择 10mM 醋酸-醋酸钠，制备含 75mg/mL 蔗糖，0.2 mg/mL 聚山梨酯 80，抗 ANGPTL3 抗体浓度 100mg/mL，pH 分别为 5.0 和 5.4 的制剂，考察震荡、冻融、光照、高温条件下抗体制剂稳定性。

10

- 1) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2 mg/mL 聚山梨酯 80，75mg/mL 蔗糖，抗 ANGPTL3 抗体浓度 100mg/mL，pH5.0
- 2) 10mM 醋酸-醋酸钠，0.2 mg/mL 聚山梨酯 80，75mg/mL 蔗糖，抗 ANGPTL3 抗体浓度 100mg/mL，pH5.4

15

表 31. 制剂 pH 对稳定性影响考察结果 1

处方组成	放置时间	外观	粒径 (nm)	%PD
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.2 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白， pH5.0	0 时	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	5.4	多峰
	震荡 48h 200rpm, RT	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	4.8	多峰
	冻融 3 次 -35°C/RT	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	5.0	多峰
	冻融 5 次 -35°C/RT	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	5.0	多峰
	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	7.1	多峰
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	5.4	多峰
	40°C-1W	无色，轻微乳光，无可见蛋白颗粒	6.3	多峰

10mM 醋酸-醋酸钠 +0.2 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白, pH5.4	40°C-2W	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.3	多峰
	40°C-4W	无色, 轻微乳光, 无可见蛋白颗粒	5.6	多峰
	0 时	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.1	29.6
	震荡 48h 200rpm, RT	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.4	36.6
	冻融 3 次 -35°C/RT	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.5	36.3
	冻融 5 次 -35°C/RT	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	8.1	多峰
	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	8.1	多峰
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	无色, 微乳光, 无少量可见蛋白颗粒	6.3	30.5
	40°C-1W	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.4	34.3
	40°C-2W	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.6	38.3
	40°C-4W	无色, 微乳光, 无可见蛋白颗粒	6.9	48.7

(注: h 表示小时; W 表示周; RT 表示室温; 粒径反映胶体稳定性; %PD 表示分散系数)

表 32. 制剂 pH 对稳定性影响考察结果 2

处方组成	放置时间	SEC		iCIEF		
		聚体%	单体%	酸性峰%	主峰%	碱性峰%
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.2 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白, pH5.0	0 时	3.6	96.4	18.9	74.0	7.1
	震荡 48h 200rpm, RT	3.6	96.3	18.2	75.2	6.6
	冻融 3 次 -35°C/RT	3.6	96.4	18.1	75.2	6.7
	冻融 5 次 -35°C/RT	3.6	96.4	17.6	76.1	6.3
	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	4.0	95.9	18.4	73.3	8.4
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	4.3	95.6	19.2	73.1	7.8
	40°C-1W	5.1	94.9	21.2	69.7	9.1

	40°C-2W	6.3	93.6	25.3	64.7	10.0
	40°C-4W	10.4	89.4	38.4	50.8	10.7
10mM 醋酸-醋酸钠 +0.2 mg/mL 聚山梨酯 80 +75mg/mL 蔗糖 +100mg/mL 蛋白, pH5.4	0 时	3.1	96.9	16.8	78.3	4.9
	震荡 48h 200rpm, RT	3.2	96.8	15.5	79.5	5.0
	冻融 3 次 -35°C/RT	3.2	96.8	15.3	78.8	5.9
	冻融 5 次 -35°C/RT	3.2	96.8	16.3	77.3	6.4
	光照 5 天 5000 Lx, 25°C	3.6	96.4	18.1	76.0	5.9
	光照 10 天 5000 Lx, 25°C	3.8	96.2	19.0	74.7	6.3
	40°C-1W	3.7	96.2	20.0	73.7	6.4
	40°C-2W	4.3	95.7	23.4	67.3	9.3
	40°C-4W	5.3	94.5	31.2	59.3	9.5

(注：h 表示小时；W 表示周；RT 表示室温)

结果表明：与 0 时相比，在震荡、冻融、光照、高温条件下，pH5.0 和 5.4 制剂的蛋白变化趋势相近，因此，抗 ANGPTL3 抗体制剂 pH 的范围定为 5.0~5.4。

0.1 mg/mL 聚山梨酯 80 和 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80，对抗体稳定性的影响不是很大，
5 所以制剂可用的聚山梨酯 80 浓度范围为 0.1~0.4mg/mL；pH 值 5.0 和 5.4 对抗体稳定性的影响不是很大，所以制剂可用 pH 范围为 5.0~5.4；抗 ANGPTL3 抗体浓度定为 100mg/mL。

实施例 13、可选择的制剂配方

此外，本公开还提供其它制剂配方的抗 ANGPTL3 抗体药物制剂，包含但不限于：

10 (1) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.1 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.0;

(2) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75mg/mL 蔗糖, 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.0;

15 (3) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.0;

(4) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.1 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.2;

(5) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.2;

(6) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.2;

(7) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.1 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.4;

5 (8) 100mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.4;

(9) 100mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.4 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液 pH5.4;

10 (10) 80 mg/mL、100 mg/mL、120 mg/mL 或 150 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 75 mg/mL 蔗糖, 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4;

(11) 100 mg/mL 抗 ANGPTL3 抗体, 60 mg/mL、70 mg/mL、75 mg/mL、80mg/mL、85 mg/mL 或 90mg/mL 蔗糖, 0.2 mg/mL 聚山梨酯 80, 和 10 mM 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 为 5.0 至 5.4。

15 实验结果表明, 上述制剂配方的抗 ANGPTL3 抗体制剂均具有良好的稳定性, 可应用于抗 ANGPTL3 抗体药物的配制。

权利要求书:

1. 一种药物组合物，其包含抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，以及缓冲剂，其中所述缓冲剂选自醋酸-醋酸钠、琥珀酸-琥珀酸钠、组氨酸-盐酸盐和枸橼酸-枸橼酸钠缓冲剂中的任一种，优选为醋酸-醋酸钠或琥珀酸-琥珀酸钠缓冲剂；
5 其中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1、LCDR2
10 和 LCDR3。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中所述的缓冲剂的 pH 为 4.0 至 7.0，优选为 5.0 至 5.4，最优选为约 5.2。
- 15 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中所述缓冲剂浓度为 5 mM 至 40 mM，优选为 5 mM 至 20 mM，最优选为约 10 mM。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的药物组合物，其中所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的浓度为 10 mg/mL 至 200 mg/mL，优选为 80 mg/mL 至 120
20 mg，最优选为约 100 mg/mL。
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的药物组合物，其还包含表面活性剂；所述的表面活性剂优选为聚山梨醇酯 80 或聚山梨醇酯 20，更优选为聚山梨醇酯 80。
25
6. 根据权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为 0.05 mg/mL 至 0.6 mg/mL，优选为 0.1 mg/mL 至 0.4 mg/mL，更优选为约 0.2 mg/mL。
7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的药物组合物，其还包括稳定剂，其中
30 所述稳定剂为糖；优选地，所述的糖选自蔗糖、海藻糖、甘露醇和山梨醇；更优选地，所述糖为蔗糖。
8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物，其中所述糖的浓度为 60 mg/mL 至 90 mg/mL，优选为 70 mg/mL 至 80 mg/mL，最优选为约 75 mg/mL。
35
9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的药物组合物，其包含：
(a) 10 mg/mL 至 200 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段，

- (b) 5 mM 至 30 mM 的醋酸盐缓冲液,
 - (c) 60 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖,
 - (d) 0.05 mg/mL 至 0.6 mg/mL 的聚山梨醇酯 80,
- 所述药物组合物的 pH 优选为 4.5 至 6.5, 更优选为 5.0 至 5.4。

5

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的药物组合物, 其包含:

- (a) 约 100 mg/mL 的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段,
- (b) 5 mM 至 15 mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液,
- (c) 60 mg/mL 至 90 mg/mL 的蔗糖,

10

- (d) 0.1 mg/mL 至 0.4mg/mL 的聚山梨醇酯 80,
- 所述药物组合物的 pH 优选为 5.0 至 5.4, 更优选为约 5.2。

15

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的药物组合物, 其中所述的抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体; 优选地, 所述人源抗体的轻链和重链 FR 序列分别来源于人种系轻链和重链的 FR。

20

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的药物组合物, 其中所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与之具有至少 90%序列同一性, 和所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与之具有至少 90%序列同一性。

25

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的药物组合物, 其中抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段包含抗体重链和轻链, 其中: 所述重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与之至少 90%序列同一性, 且所述轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与之具有至少 90%序列同一性。

30

14. 制备权利要求 1 至 13 中任一项所述的药物组合物的方法, 包括将所述抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段原液经缓冲剂置换的步骤, 其中所述的缓冲剂优选为醋酸-醋酸钠缓冲剂。

15. 一种含抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的冻干制剂, 所述冻干制剂通过将权利要求 1 至 13 中任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得; 优选地, 所述冷冻干燥依次包括预冻、一次干燥和二次干燥的步骤。

35

16. 一种含有抗 ANGPTL3 抗体或其抗原结合片段的复溶溶液, 其中所述的复溶溶液是通过将权利要求 15 所述的冻干制剂经复溶获得。

17. 一种制品, 其包括容器, 该容器中装有权利要求 1 至 13 中任一项所述的

药物组合物，或权利要求 15 所述的冻干制剂，或权利要求 16 所述的复溶溶液。

18. 权利要求 1 至 13 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 15 所述的冻干制剂，或权利要求 16 所述的复溶溶液在制备用于治疗 and/或预防疾病或病症的药物中的用途；

优选地，所述疾病或病症选自高脂血症、高脂蛋白血症、血脂异常、心血管疾病或病症、癌症或肿瘤、非肿瘤性血管生成相关疾病或病症、以及炎性疾病或病症中的一种或多种；

更优选地，所述疾病或病症选自动脉粥样硬化性血脂异常、糖尿病性血脂异常、高甘油三酸酯血症、高胆固醇血症、乳糜微粒血症、混合血脂异常、脂肪营养不良、脂肪萎缩、动脉粥样硬化、动脉瘤、高血压、心绞痛、中风、脑血管疾病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、心肌梗塞、周围血管疾病、急性胰腺炎、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、血糖异常、年龄相关性黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞或视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、关节炎、类风湿性关节炎(RA)和牛皮癣中的一种或多种。

19. 一种治疗和/或预防疾病或病症的方法，包括向有需要的受试者施用权利要求 1 至 13 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 16 所述的复溶溶液；

优选地，所述疾病或病症选自高脂血症、高脂蛋白血症、血脂异常、心血管疾病或病症、癌症或肿瘤、非肿瘤性血管生成相关疾病或病症、以及炎性疾病或病症中的一种或多种；

更优选地，所述疾病或病症选自动脉粥样硬化性血脂异常、糖尿病性血脂异常、高甘油三酸酯血症、高胆固醇血症、乳糜微粒血症、混合血脂异常、脂肪营养不良、脂肪萎缩、动脉粥样硬化、动脉瘤、高血压、心绞痛、中风、脑血管疾病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、心肌梗塞、周围血管疾病、急性胰腺炎、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、血糖异常、年龄相关性黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞或视网膜分支静脉阻塞、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、关节炎、类风湿性关节炎(RA)和牛皮癣中的一种或多种。

30