



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I861347 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：110102504

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 22 日

(51)Int. Cl. : C07K16/22 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P3/06 (2006.01)

(30)優先權：2020/01/22

中國大陸

202010073192.4

(71)申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(中國大陸)JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商上海恆瑞醫藥有限公司(中國大陸)SHANGHAI HENGRUI

PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：付雅媛 FU, YAYUAN (CN)；許迎霞 XU, YINGXIA (CN)；林冰 LIN, BING (CN)；陶維康 TAO, WEIKANG (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 103732624A

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：9 共 91 頁

(54)名稱

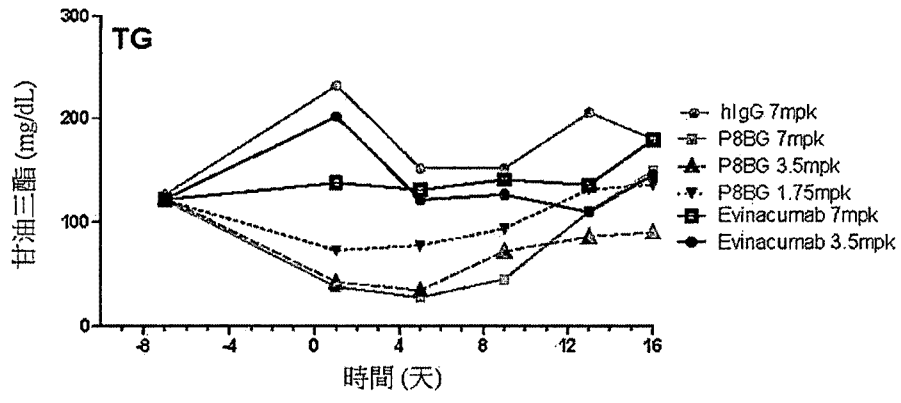
抗ANGPTL3抗體及其應用

(57)摘要

本披露涉及抗ANGPTL3抗體及其應用。具體地，本披露涉及一種抗ANGPTL3抗體及其抗原結合片段，或其可藥用鹽或溶劑化合物，以及其作為藥物的用途，尤其在製備用於治療高脂血症的藥物中的用途。

This disclosure relates to anti-ANGPTL3 antibody and usage thereof. Specifically, this disclosure relates to an anti-ANGPTL3 antibody and antigen-binding fragment thereof, or medicinal salt thereof or solvent compound thereof, and its use as a drug, particularly in the preparation of a drug for the treatment of hyperlipidemia.

指定代表圖：



【圖1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗ANGPTL3抗體及其應用

【英文發明名稱】 ANTI-ANGPTL3 ANTIBODY AND USAGE THEREOF

【中文】

本披露涉及抗ANGPTL3抗體及其應用。具體地，本披露涉及一種抗ANGPTL3抗體及其抗原結合片段，或其可藥用鹽或溶劑化合物，以及其作為藥物的用途，尤其在製備用於治療高脂血症的藥物中的用途。

【英文】

This disclosure relates to anti-ANGPTL3 antibody and usage thereof. Specifically, this disclosure relates to an anti-ANGPTL3 antibody and antigen-binding fragment thereof, or medicinal salt thereof or solvent compound thereof, and its use as a drug, particularly in the preparation of a drug for the treatment of hyperlipidemia.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗ANGPTL3抗體及其應用

【英文發明名稱】 ANTI-ANGPTL3 ANTIBODY AND USAGE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本披露涉及抗體藥物領域。具體地包括抗ANGPTL3抗體藥物以及其應用。

【先前技術】

【0002】 這裡的陳述僅提供與本發明有關的背景信息，而不必然地構成現有技術。

【0003】 類血管生成素蛋白3（ANGPTL3、ANGPTL-3）基因是Conklin等人基於信號序列和兩親性螺旋結構從EST數據庫鑒定出的新基因，其從人胚胎肝/脾cDNA文庫分離出人ANGPTL3的全長cDNA（Conklin et al.,1999,Genomics62：477-482）。由460個胺基酸組成的人ANGPTL3蛋白（hANGPTL3）與小鼠ANGPTL3蛋白具有76%胺基酸序列同一性，並具有血管生成素的特徵結構，包括一個信號肽、一個預期將形成二聚或三聚捲曲螺旋的伸展的螺旋結構域、一個短連接肽，以及一個球狀纖維蛋白原同源結構域（FD）（Conklin et al.,1999,Genomics62：477-482）。ANGPTL3不同於血管生成素（ANGs），ANGPTL3不與Tie2結合，但是，藉由它的C-端FD與整聯蛋白 $\alpha v \beta 3$ 結合，它也可誘導血管生成（Camenisch et al.,2002,J Biol Chem277:17281-17290）。

【0004】另外，ANGPTL3是影響脂肪代謝的一個重要的因子，ANGPTL3可以抑制LPL的活性，從而降低甘油三酯、低密度脂蛋白的清除率，而高甘油三酯血症參與了一系列代謝性疾病的發病過程。血漿甘油三酯水平升高可藉由誘導血小板聚集和血漿纖溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)的產生，以及增加泡沫細胞的數量和促進血管平滑肌細胞的增殖和遷移，從而參與動脈粥樣硬化的病理過程。抗ANGPTL3抗體可以與ANGPTL3特異性結合，從而抑制或干擾ANGPTL3活性，進而治療動脈粥樣硬化以及高脂血症等疾病。目前，WO2012174178A1、WO2008073300A2、CN107085112A等專利文獻中公開多種抗ANGPTL3抗體。

【發明內容】

【0005】本披露提供一種抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，本披露提供一種抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其包含抗體重鏈可變區和輕鏈可變區，其中：

【0006】i) 該重鏈可變區包含與如SEQ ID NO：9序列所示的重鏈可變區具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，該輕鏈可變區包含與如SEQ ID NO：10序列所示的輕鏈可變區具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

【0007】ii) 該重鏈可變區包含與如SEQ ID NO：11序列所示的重鏈可變區具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，該輕鏈可變區包含與如SEQ ID NO：12序列所示的輕鏈可變區具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或者

【0008】 iii) 該重鏈可變區包含與如SEQ ID NO：13序列所示的重鏈可變區具有相同序列的HCDR1、HCDR2和HCDR3，該輕鏈可變區包含與如SEQ ID NO：14序列所示的輕鏈可變區具有相同序列的LCDR1、LCDR2和LCDR3。

【0009】 在一些實施方案中，如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中：

【0010】 iv) 該重鏈可變區包含序列分別如SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：19和SEQ ID NO：20所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，該輕鏈可變區包含序列分別如SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：16和SEQ ID NO：17所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；

【0011】 v) 該重鏈可變區包含序列分別如SEQ ID NO：24、SEQ ID NO：25和SEQ ID NO：26所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，該輕鏈可變區包含序列分別如SEQ ID NO：21、SEQ ID NO：22和SEQ ID NO：23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3；或者

【0012】 vi) 該重鏈可變區包含序列分別如SEQ ID NO：24、SEQ ID NO：28和SEQ ID NO：26所示的HCDR1、HCDR2和HCDR3，該輕鏈可變區包含序列分別如SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：22和SEQ ID NO：23所示的LCDR1、LCDR2和LCDR3。在一些實施方案中，如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中：

【0013】 (A) 該重鏈可變區與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/或該輕鏈可變區與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) 該重鏈可變區與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/或該輕鏈可變區與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) 該重鏈可變區與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/或該輕鏈可變區與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】 在一些實施方案中，如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其包含如下所示的重鏈可變區和輕鏈可變區：

【0017】 (D) 該重鏈可變區序列如SEQ ID NO:9所示，和該輕鏈可變區序列如SEQ ID NO：10所示；

【0018】 (E) 該重鏈可變區序列如SEQ ID NO:11所示，和該輕鏈可變區序列如SEQ ID NO：12所示；或者

【0019】 (F) 該重鏈可變區序列如SEQ ID NO:13所示，和該輕鏈可變區序列如SEQ ID NO：14所示。

【0020】 在一些實施方案中，如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其中該抗ANGPTL3抗體進一步包含重鏈恆定區和輕鏈恆定區；在一些實施方案中，該重鏈恆定區選自人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4恆定區，該輕鏈恆定區選自人 κ 和 λ 鏈恆定區；在一些實施方案中，該重鏈恆定區序列如SEQ ID NO:29所示或與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/或該輕鏈恆定區序列如SEQ ID NO:30所示或與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。在一些實施方案中，如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其中該抗ANGPTL3抗體包含重鏈和輕鏈，其中，

【0021】 (G) 該重鏈與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/或該輕鏈與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) 該重鏈與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/或該輕鏈與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) 該重鏈與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/或該輕鏈與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】 在一些實施方案中，如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，其中該抗ANGPTL3抗體包含重鏈和輕鏈，其中，

【0025】 (J) 該重鏈序列如SEQ ID NO：31所示，和輕鏈序列如SEQ ID NO：32所示；

【0026】 (K) 該重鏈序列如SEQ ID NO：33所示，和輕鏈序列如SEQ ID NO：34所示；或

【0027】 (L) 該重鏈序列如SEQ ID NO：35所示，和輕鏈序列如SEQ ID NO：36所示。

【0028】 在一些實施方案中，本披露提供一種分離的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，該抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段與前述抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段競爭性結合ANGPTL3抗原。在一些實施方案中，該ANGPTL3抗原為人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、猴 ANGPTL3、大鼠ANGPTL3。

【0029】 在一些實施方案中，本披露所述的抗體是人抗體或人源抗體。在一些實施方案中，本披露所述的抗原結合片段選自：Fab、F(ab')₂、Fab'、Fd、Fv、dsFv、scFv、Fab和雙抗體。在一些實施方案中，本披露抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段具有以下a-d特徵中的至少一種：

【0030】 a. 與ANGPTL3蛋白特異性結合。在一些實施方案中，該抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段以小於10 nM（例如小於或等於5 nM、小於或等於3 nM、小於或等於1nM、小於或等於0.8nM、小於或等於0.6nM、小於或等於0.4nM、小於或等於0.3nM、小於或等於0.2nM）的EC₅₀與人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、食蟹猴ANGPTL3和/或大鼠ANGPTL3結合；在一些實施方案中，該EC₅₀是藉由ELISA方法測定，例如本披露的測試例1所述；在一些實施方案中，該EC₅₀是藉由HTRF方法測定，例如本披露的測試例2所述；

【0031】 b · 以高親和力結合ANGPTL3蛋白。在一些實施方案中，該抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段以小於 $10E-10$ M（例如小於或等於 $9E-10$ M、小於或等於 $8E-10$ M、小於或等於 $7E-10$ M、小於或等於 $6E-10$ M、小於或等於 $3E-10$ M、小於或等於 $2E-10$ M、小於或等於 $1E-10$ M、小於或等於 $8E-11$ M、小於或等於 $6E-11$ M、小於或等於 $5E-11$ M）的KD值與人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、食蟹猴ANGPTL3和/或大鼠ANGPTL3抗原結合；在一些實施方案中，該KD值是藉由Biacore方法測定的，例如本披露的測試例4所述；

【0032】 c · 阻斷ANGPTL3對LPL酶的抑制作用。在一些實施方案中，該抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段以小於 170 nM（例如小於或等於 80 nM、小於或等於 135 nM、小於或等於 80 nM、小於或等於 55 nM）的IC₅₀值阻斷人ANGPTL3、小鼠ANGPTL3、食蟹猴ANGPTL3和/或大鼠ANGPTL3對LPL酶活性的抑制。該IC₅₀可藉由酶活實驗測定，例如本披露的測試例3所述；和/或

【0033】 d · 具有良好降脂效果。在一些實施方案中，本披露的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段的降脂效果如測試例5、6和/或7所示。在一些實施方案中，本披露提供一種核酸分子，其編碼前述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段。

【0034】 在一些實施方案中，本披露提供一種載體，其包含前述的核酸分子。

【0035】 在一些實施方案中，本披露提供一種宿主細胞，其包含前述的核酸分子。在一些實施方案中，本披露提供一種宿主細胞，其由前述的載體轉化（或轉導、轉染）獲得；該宿主細胞選自原核細胞和真核細胞，較佳為真核細胞，更較佳哺乳動物細胞。在一些實施方案中，該宿主細胞不包括任何能夠發

育成完整個體的人細胞，如人胚胎乾細胞、受精卵、生殖細胞；在一些實施方案中，該宿主細胞為真核細胞，更佳哺乳動物細胞，其中該哺乳動物細胞包括但不限於CHO、293、NSO，以及在哺乳動物細胞中進行基因編輯可改變抗體或其抗原結合片段的糖基化修飾，進而改變抗體或其抗原結合片段的ADCC功能的細胞，例如，剔除FUT8或GnT-III等基因；在一些實施方案中，該哺乳動物細胞不包括人細胞。

【0036】 在一些實施方案中，本披露提供一種醫藥組成物，其含有治療有效量的前述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，或前述的核酸分子，以及一種或更多種藥學上可接受的載體、稀釋劑、緩衝劑或賦形劑。在一些實施方案中，該醫藥組成物單位劑量中含有0.01至99重量%的前述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，或前述的核酸分子。在一些實施方案中，該醫藥組成物單位劑量中含有0.1-2000mg，更佳為1-1000mg的前述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，或前述的核酸分子。

【0037】 在一些實施方案中，本披露提供一種用於免疫檢測或測定ANGPTL3的方法，該方法包括前述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段。在另一方面，本披露提供一種體外檢測受試者樣品中ANGPTL3表達水平的方法，該方法包括使本披露中所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段與該樣品接觸的步驟；在一些實施方案中，該樣品為來自受試者的血漿、血清、全血樣品。在一些實施方案中，可以使用本領域技術人員公知的任何方法檢測ANGPTL3的表達水平，這樣的方法包括但不限於：Western blot、免疫印跡、ELISA、質譜法。

【0038】 在一些實施方案中，本披露提供一種試劑盒，其包含前述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段。

【0039】 在一些實施方案中，本披露提供一種如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段的製備方法。

【0040】 在一些實施方案中，本披露提供如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段在製備免疫檢測ANGPTL3的試劑中的用途。

【0041】 在一些實施方案中，本披露提供一種用於免疫檢測或測定ANGPTL3的如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段；

【0042】 在一些實施方案中，本披露提供一種試劑盒，其包含根據如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，本披露提供一種用於檢測ANGPTL3表達水平的試劑盒，其包含根據如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，該試劑盒用於本披露所述的ANGPTL3表達水平的檢測方法中；在一些實施方案中，該檢測方法為本領域技術人員公知的任何方法，包括但不限於，Western blot、免疫印跡、ELISA、質譜法。

【0043】 在一些實施方案中，本披露提供一種治療疾病或病症的方法，該方法包括向受試者施用治療有效量的如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，或核酸分子，或醫藥組成物；在一些實施方案中，該疾病或病症為ANGPTL3相關的疾病或病症；在一些實施方案中，該疾病或病症為高膽固醇血症、高脂血症或動脈粥樣硬化疾病。

【0044】 在一些實施方案中，本披露提供如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，或核酸分子，或醫藥組成物在製備用於治療疾病或病症的藥物中的用途。在一些實施方案中，該疾病或病症為ANGPTL3相關的疾病或病

症；在一些實施方案中，該疾病或病症為高膽固醇血症、高脂血症或動脈粥樣硬化疾病。

【0045】 在一些實施方案中，本披露提供作為藥物的如前所述的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，或核酸分子，或醫藥組成物。在一些實施方案中，該藥物用於治療ANGPTL3相關的疾病或病症；在一些實施方案中，該疾病或病症為高膽固醇血症、高脂血症或動脈粥樣硬化疾病。

發明詳述

術語（定義）

【0046】 為了更容易理解本披露，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本披露所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

【0047】 本披露所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如J.biol.chem，243，p3558(1968)中該。

【0048】 本披露所述的“抗體”指免疫球蛋白，天然完整抗體是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。根據免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈、和 ϵ 鏈。同一類Ig根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如IgG可分為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五類Ig中每類Ig都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

【0049】抗體重鏈和輕鏈靠近N端的約110個胺基酸的序列變化很大，為可變區（Fv區）；靠近C端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區。可變區包括3個高變區（HVR）和4個序列相對保守的骨架區（FR）。3個高變區決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區（CDR）。每條輕鏈可變區（VL）和重鏈可變區（VH）由3個CDR區4個FR區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。輕鏈的3個CDR區指LCDR1、LCDR2、和LCDR3；重鏈的3個CDR區指HCDR1、HCDR2和HCDR3。

【0050】本披露“抗體”除包括全長抗體外，還包括能結合抗原的抗原結合片段。

【0051】本披露的抗體包括人抗體。

【0052】術語“鼠源抗體”在本披露中為根據本領域知識和技能製備的針對人ANGPTL3的單株抗體。製備時可用ANGPTL3抗原注射試驗對象，然後分離表達具有所需序列或功能特性的抗體的融合瘤。在本披露一個較佳的實施方案中，該鼠源抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或其變體的重鏈恆定區。

【0053】術語“嵌合抗體（chimeric antibody）”，是將異源（例如鼠源）性抗體的可變區與親本抗體（例如人抗體）的恆定區融合而成的抗體，可以減輕異源性抗體誘發的免疫應答反應。例如，人鼠嵌合抗體，建立嵌合抗體，要先建立分泌鼠源性特異性單抗的融合瘤，然後從鼠融合瘤細胞中選殖可變區基因，再根據需要選殖人抗體的恆定區基因，將鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入表達載體中，最後在真核系統或原核系統中表達嵌合抗體

分子。在本披露一個較佳的實施方案中，該抗ANGPTL3嵌合抗體的抗體輕鏈進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。該ANGPTL3嵌合抗體的抗體重鏈進一步包含人源IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源IgG1、IgG2或IgG4重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變(例如L234A和/或L235A突變，和/或S228P突變)的IgG1、IgG2或IgG4變體。

【0054】術語“人源化抗體 (humanized antibody)”，也稱為CDR移植抗體 (CDR-grafted antibody)，是指將鼠的CDR序列移植到人的抗體可變區框架，即不同類型的人種系抗體框架序列中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量鼠蛋白成分，從而誘導的異源性反應。此類構架序列可以從包括種系抗體基因序列的公共DNA數據庫或公開的參考文獻獲得。如人重鏈和輕鏈可變區基因的種系DNA序列可以在“VBase”人種系序列數據庫獲得，以及在Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版中找到。為避免免疫原性下降的同時，引起的活性下降，可對該人抗體可變區框架序列進行最少反向突變或回復突變，以保持活性。本披露的人源化抗體也包括進一步由酵母菌展示對CDR進行親和力成熟突變後的人源化抗體。

【0055】術語“人抗體”與“人源抗體”可以互換使用，是指有一或多個可變區和恆定區來源於人免疫球蛋白序列。其中一個較佳的方式是所有的可變區和恆定區均來自於人免疫球蛋白序列，即“完全人源抗體”或“全人抗體”。這些抗體可以藉由多種方式製備獲得，包括藉由噬菌體展示技術，從人PBMC、脾臟、淋巴結組織分離B細胞，構建天然單鏈噬菌體人抗體庫，或者藉由免疫可表達人抗體輕重鏈的轉基因小鼠，篩選獲得的抗體。本披露的人抗體

還包括在人抗體基礎上經過一個或更多個胺基酸的突變獲得的仍結合目標抗原的抗體。

【0056】本披露中該人抗體重鏈恆定區和人抗體輕鏈恆定區的“常規變體”是指現有技術已公開的來源於人的不改變抗體可變區結構和功能的重鏈恆定區或輕鏈恆定區的變體，示例性變體包括對重鏈恆定區進行定點改造和胺基酸替換的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4重鏈恆定區變體，具體替換如現有技術已知的YTE突變、L234A和/或L235A突變、S228P突變、和/或獲得knob-into-hole結構的突變（使得抗體重鏈具有knob-Fc和hole-Fc組合），這些突變已被證實使得抗體具有新的性能，但不改變抗體可變區的功能。

【0057】術語“全長抗體”、“完整抗體”、“完全抗體”和“全抗體”在本文中可互換使用，指基本上完整形式的抗體，與下文定義的抗原結合片段相區分。該術語特別指輕鏈和重鏈包含恆定區的抗體。本披露“抗體”包含“全長抗體”及其抗原結合片段。

【0058】在一些實施方案中，本披露的全長抗體包括由輕鏈可變區與輕鏈恆定區連接和重鏈可變區與重鏈恆定區連接後所形成的全長抗體。本領域技術人員可以根據實際需要選擇不同的抗體來源的輕鏈恆定區、重鏈恆定區，例如人抗體來源的輕鏈恆定區和重鏈恆定區。

【0059】術語“抗原結合片段”或“功能片段”是指抗體的保持特異性結合抗原(例如，ANGPTL3)的能力的一個或更多個片段。已顯示可利用全長抗體的片段來實現抗體的抗原結合功能。術語“抗原結合片段”中包含的結合片段的實例包括(i)Fab 片段，由VL、VH、CL 和CH1 結構域組成的單價片段；(ii)F(ab')₂片段，包含藉由鉸鏈區上的二硫橋連接的兩個Fab 片段的二價片段，

(iii) 由VH和CH1結構域組成的Fd片段；(iv) 由抗體的單臂的VH和VL結構域組成的Fv片段；(v) dsFv，由VH和VL經鏈間二硫鍵形成的穩定的抗原結合片段；(vi) 包含scFv、dsFv、Fab等片段的雙抗體、雙特異性抗體和多特異性抗體。此外，雖然Fv片段的兩個結構域VL和VH由分開的基因編碼，但可使用重組方法，藉由合成的接頭連接它們，從而使得其能夠產生為其中VL和VH區配對形成單價分子的單個蛋白質鏈(稱為單鏈Fv(scFv))；參見，例如，Bird等人(1988)Science242:423-426；和Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883)。此類單鏈抗體也包括在術語抗體的“抗原結合片段”中。使用本領域技術人員已知的常規技術獲得此類抗體片段，並且以與對於完整抗體的方式相同的方式就功用性篩選片段。可藉由重組DNA技術或藉由酶促或化學斷裂完整免疫球蛋白來產生抗原結合部分。抗體可以是不同同種型的抗體，例如，IgG(例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM抗體。

【0060】 Fab可藉由用蛋白酶木瓜蛋白酶(切割H鏈的224位的胺基酸殘基)處理IgG抗體分子所獲得具有約50,000的分子量並具有抗原結合活性的抗體片段，其中H鏈N端側的約一半和整個L鏈藉由二硫鍵結合在一起。

【0061】 F(ab')₂可藉由用酶胃蛋白酶消化IgG鉸鏈區中兩個二硫鍵的下方部分而獲得分子量為約100,000並具有抗原結合活性並包含在鉸鏈位置相連的兩個Fab區的抗體片段。

【0062】 Fab'可藉由切割上述F(ab')₂的鉸鏈區的二硫鍵而獲得的分子量為約50,000並具有抗原結合活性的抗體片段。本披露的Fab'可以藉由用還原劑例如二硫蘇糖醇處理本披露的特異性識別ANGPTL3並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的F(ab')₂來生產。

【0063】此外，可以藉由將編碼抗體的Fab'片段的DNA插入到原核生物表達載體或真核生物表達載體中並將載體導入到原核生物或真核生物中以表達Fab'來生產該Fab'。

【0064】術語“單鏈抗體”、“單鏈Fv”或“scFv”意指包含藉由接頭連接的抗體重鏈可變結構域(或區域；VH)和抗體輕鏈可變結構域(或區域；VL)的分子。此類scFv分子可具有一般結構：NH₂-VL-接頭-VH-COOH或NH₂-VH-接頭-VL-COOH。合適的現有技術接頭由重複的GGGGS胺基酸序列或其變體組成，例如使用1-4個重複的變體(Holliger等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448)。可用於本披露的其他接頭由Alfthan等人(1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi等人(2001)，Eur.J.Immunol.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。

【0065】雙抗體是其中scFv或Fab被二聚體化的抗體片段，是具有二價抗原結合活性的抗體片段。在二價抗原結合活性中，兩個抗原可以是相同或不同的。

【0066】雙特異性抗體和多特異性抗體是指能同時結合兩個或多個抗原或抗原決定簇的抗體，其中包含能結合ANGPTL3的scFv或Fab片段。

【0067】本披露的雙抗體可以藉由以下步驟來生產：獲得本披露的特異性識別人ANGPTL3並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的單株抗體的VH和VL的編碼cDNA，構建編碼scFv的DNA以使肽接頭的胺基酸序列長度為8個殘基或更少，將該DNA插入到原核生物表達載體或真核生物表達載體中，然後將該表達載體導入到原核生物或真核生物中以表達雙抗體。

【0068】 dsFv是藉由將其中每個VH和VL中的一個胺基酸殘基被半胱胺酸殘基取代的多肽經由半胱胺酸殘基之間的二硫鍵相連而獲得的。可以按照已知方法 (Protein Engineering, 7, 697(1994)) 基於抗體的三維結構預測來選擇被半胱胺酸殘基取代的胺基酸殘基。

【0069】 本披露的全長抗體或抗原結合片段可以藉由以下步驟來生產：獲得本披露的特異性識別人ANGPTL3並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的抗體的編碼cDNA，構建編碼dsFv的DNA，將該DNA插入到原核生物表達載體或真核生物表達載體中，然後將該表達載體導入到原核生物或真核生物中以表達dsFv。

【0070】 術語“胺基酸差異”或“胺基酸突變”是指相較於原蛋白質或多肽，變體蛋白質或多肽存在胺基酸的改變或突變，包括在原蛋白質或多肽的基礎上發生1個、2個、3個或更多個胺基酸的插入、缺失或替換。

【0071】 術語“抗體框架”或“FR區”，是指可變結構域VL或VH的一部分，其用作該可變結構域的抗原結合環(CDR)的支架。從本質上講，其是不具有CDR的可變結構域。

【0072】 術語“互補決定區”、“CDR”或“高變區”是指抗體的可變結構域內主要促成抗原結合的6個高變區之一。通常，每個重鏈可變區中存在三個CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每個輕鏈可變區中存在三個CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各種公知方案中的任何一種來確定CDR的胺基酸序列邊界，包括“Kabat”編號規則 (參見Kabat等(1991)，

“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、“Chothia”編號規則 (參見Al-99056

Lazikani等人, (1997)JMB 273 : 927-948)和ImMunoGenTics(IMG T)編號規則(Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)等。

【0073】術語“表位”或“抗原決定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗體特異性結合的部位(例如, ANGPTL3分子上的特定部位)。表位通常以獨特的空間構象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個連續或非連續的胺基酸。參見, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷, G.E.Morris, Ed.(1996)。

【0074】術語“特異性結合”、“選擇性結合”、“選擇性地結合”和“特異性地結合”、“能夠特異性地結合”是指抗體對預先確定的抗原上的表位的結合。通常, 抗體以大約小於 10^8 M, 例如大約小於 10^9 M、 10^{10} M、 10^{11} M、 10^{12} M或更小的親和力(KD)結合。

【0075】術語“KD”是指特定抗體-抗原相互作用的解離平衡常數。通常, 本披露的抗體以小於大約 10^7 M, 例如小於大約 10^8 M或 10^9 M的解離平衡常數(KD)結合ANGPTL3, 例如, 在本披露中抗體與細胞表面抗原的親和力採用FACS法測定KD值; 在另一些實施方案中, 抗體與抗原的親和力KD值採用Biacore法測定; 在另一些實施方案中, 抗體與抗原的結合採用ELISA法測定。

【0076】當術語“競爭”用於競爭相同表位的抗原結合蛋白(例如中和抗原結合蛋白或中和抗體)的情況中時, 意指在抗原結合蛋白之間競爭, 其藉由以下測定法來測定: 在該測定法中, 待檢測的抗原結合蛋白(例如抗體或其免疫學功能片段)防止或抑制(例如降低)參考抗原結合蛋白(例如配體或參考抗體)與共同抗原(例如ANGPTL3抗原或其片段)的特異性結合。眾多類型的競

爭性結合測定可用於確定一種抗原結合蛋白是否與另一種競爭，這些測定例如：固相直接或間接放射免疫測定(RIA)、固相直接或間接酶免疫測定(EIA)、夾心競爭測定(參見例如Stahli等, 1983, Methods in Enzymology 9 : 242-253)；固相直接生物素-親和素EIA(參見例如Kirkland等, 1986, J.Immunol.137 : 3614-3619)、固相直接標記測定、固相直接標記夾心測定(參見例如Harlow和Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual(抗體, 實驗室手冊), Cold Spring Harbor Press)；用¹²⁵I標記物的固相直接標記RIA(參見例如Morel等, 1988, Molec.Immunol.25 : 7-15)；固相直接生物素-親和素EIA(參見例如Cheung, 等, 1990, Virology176 : 546-552)；和直接標記的RIA(Moldenhauer等, 1990, Scand.J.Immunol.32 : 77-82)。通常該測定法涉及使用結合荷有未標記的檢測抗原結合蛋白及標記的參考抗原結合蛋白任一種的固態表面或細胞的純化的抗原。藉由測量在所測抗原結合蛋白存在下結合固態表面或細胞的標記的量來測量競爭性抑制。通常所測抗原結合蛋白過量存在。由競爭性測定(競爭抗原結合蛋白)鑒定的抗原結合蛋白包括：結合與參考抗原結合蛋白同一表位的抗原結合蛋白；和結合充分接近參考抗原結合蛋白的結合表位的鄰近表位的抗原結合蛋白，該兩個表位在空間上互相妨礙發生結合。在本文實施例中提供關於用於測定競爭性結合的方法的其它詳細資料。通常當競爭的抗原結合蛋白過量存在時，其將抑制(例如降低)至少40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或75%或更多參考抗原結合蛋白與共同抗原的特異性結合。在某些情況下，結合被抑制至少80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或97%或更多。

【0077】 本文中使用的術語“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是單鏈或雙鏈的，較佳是雙鏈DNA或單鏈mRNA或修飾的mRNA。

當將核酸與另一個核酸序列置於功能關係中時，核酸是“有效連接的”。例如，如果啟動子或增強子影響編碼序列的轉錄，那麼啟動子或增強子有效地連接至該編碼序列。

【0078】 胺基酸序列“同一性”指在比對胺基酸序列及必要時引入間隙，以達成最大序列同一性百分比，且不將任何保守性取代視為序列同一性的一部分，第一序列中與第二序列中的胺基酸殘基同一的胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列同一性百分比的目的，比對可以藉由本領域公知的多種方式來實現，例如使用公開可得到的計算機軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)軟體。本領域技術人員可確定適用於測量比對的參數，包括在所比較的序列全長上達成最大比對所需的任何算法。

【0079】 術語“表達載體”是指能夠運輸已與其連接的另一個核酸的核酸分子。在一個實施方案中，載體是“質粒”，其是指可將另外的DNA 區段連接至其中的環狀雙鏈DNA 環。在另一個實施方案中，載體是病毒載體，其中可將另外的DNA 區段連接至病毒基因組中。本文中公開的載體能夠在已引入它們的宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌的複製起點的細菌載體和附加型哺乳動物載體) 或可在引入宿主細胞後整合入宿主細胞的基因組，從而隨宿主基因組一起複製(例如，非附加型哺乳動物載體)。

【0080】 現有技術中熟知生產和純化抗體和抗原結合片段的方法，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5-8章和15章。例如，鼠可以用人ANGPTL3或其片段免疫，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。發明所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的CDR區加上一個或更多個人源FR區。人FR種系序列可以

藉由比對IMGT人類抗體可變區種系基因數據庫和MOE軟體，從ImMunoGeneTics(IMGT)的網站得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351上獲得。

【0081】術語“宿主細胞”是指已向其中引入了表達載體的細胞。宿主細胞可包括細菌、微生物、植物或動物細胞。易於轉化的細菌包括腸桿菌科(enterobacteriaceae)的成員，例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)或沙門氏菌(*Salmonella*)的菌株；芽孢桿菌科(Bacillaceae)例如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；鏈球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。適當的微生物包括釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。適當的動物宿主細胞系包括CHO(中國倉鼠卵巢細胞系)、293細胞和INS0細胞。

【0082】本披露工程化的抗體或抗原結合片段可用常規方法製備和純化。比如，編碼重鏈和輕鏈的cDNA序列，可以選殖並重組至GS表達載體。重組的免疫球蛋白表達載體可以穩定地轉染CHO細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表達系統會導致抗體的糖基化，特別是在Fc區的高度保守N端位點。藉由表達與人ANGPTL3特異性結合的抗體得到穩定的純株。陽性的純株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用常規技術純化。比如，用含調整過的緩衝液的A或G Sepharose FF管柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用pH梯度法沖提結合的抗體，用SDS-PAGE檢測抗體片段，收集。抗體可用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70°C，或者凍乾。

【0083】 “施用”、“給予”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組合物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“施用”、“給予”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。“施用”、“給予”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組合物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0084】 “治療”意指給予患者內用或外用治療劑，例如包含本披露的任一種結合化合物的組合物，該患者具有一種或多種疾病症狀，而已知該治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，以誘導這類症狀退化或抑制這類症狀發展到任何臨床可測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量（也稱作“治療有效量”）可根據多種因素變化，例如患者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本披露的實施方案（例如治療方法或製品）在緩解每個目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如Student t檢驗、卡方檢驗、依據Mann和Whitney的U檢驗、Kruskal-Wallis檢驗（H檢驗）、Jonckheere-Terpstra檢驗和Wilcoxon檢驗確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

【0085】 “保守修飾” 或 “保守置換或取代” 是指具有類似特徵（例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象和剛性等）的其它胺基酸置換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性（參見例如Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene，The Benjamin/Cummings Pub.Co.，第224頁，（第4版））。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破壞生物學活性。示例性保守取代於下表“示例性胺基酸保守取代” 中陳述。

【0086】表1. 示例性胺基酸保守取代

原始殘基	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

【0087】 “有效量” 或 “有效劑量” 指獲得任一種或多種有益的或所需的治療結果所必需的藥物、化合物或醫藥組成物的量。對於預防用途，有益的或所需的結果包括消除或降低風險、減輕嚴重性或延遲病症的發作，包括病症、其併發症和在病症的發展過程中呈現的中間病理表型的生物化學、組織學和/或行為症狀。對於治療應用，有益的或所需的結果包括臨床結果，諸如減少各種本披露靶抗原相關病症的發病率或改善該病症的一個或更多個症狀，減少治療病症所需的其它藥劑的劑量，增強另一種藥劑的療效，和/或延緩患者的本披露靶抗原相關病症的進展。

【0088】 “外源性” 指根據情況在生物、細胞或人體外產生的物質。“內源性” 指根據情況在細胞、生物或人體內產生的物質。

【0089】 本文使用的表述“細胞”、“細胞系”和“細胞培養物”可互換使用，並且所有這類名稱都包括後代。因此，單詞“轉化體”和“轉化細胞”包括原代受試細胞和由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在DNA含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

【0090】 本文使用的“聚合酶鏈式反應”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA和/或DNA如在例如美國專利號4,683,195中該擴增的程序或技術。一般來說，需要獲得來自目標區域末端或之外的序列信息，使得可以設計寡核苷酸引子；這些引子在序列方面與待擴增模板的對應鏈相同或相似。2個引子的5'末端核苷酸可以與待擴增材料的末端一致。PCR可用於擴增特定的RNA序列、來自總基因組DNA的特定DNA序列和由總細胞RNA轉錄的cDNA、

噬菌體或質粒序列等。一般參見Mullis等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich編輯, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的PCR被視為用於擴增核酸測試樣品的核酸聚合酶反應法的一個實例，但不是唯一的實例，該方法包括使用作為引子的已知核酸和核酸聚合酶，以擴增或產生核酸的特定部分。

【0091】 “分離的”指純化狀態，並且在這種情況下意味著在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白質、脂質、碳水化合物或其他材料，例如細胞碎片和生長培養基。通常，術語“分離的”並不意圖指完全不存在這些材料或不存在水、緩衝液或鹽，除非它們以顯著干擾如本文所述的化合物的實驗或治療用途的量存在。

【0092】 “任選”或“任選地”意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。

【0093】 “醫藥組成物”表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，該其他組分例如生理學/可藥用的載體和賦形劑。醫藥組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【0094】 術語“藥學上可接受的載體”指適合用於製劑中用於遞送抗體或抗原結合片段的任何無活性物質。載體可以是抗黏附劑、黏合劑、包衣、崩解劑、充填劑或稀釋劑、防腐劑（如抗氧化劑、抗菌劑或抗真菌劑）、增甜劑、吸收延遲劑、潤濕劑、乳化劑、緩衝劑等。合適的藥學上可接受的載體的示例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）右旋糖、植物油

(例如橄欖油)、鹽水、緩衝液、緩衝的鹽水和等滲劑例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化鈉。

【0095】此外，本披露包括用於治療與目標抗原（例如ANGPTL3）陽性細胞相關的疾病的藥劑，該藥劑包含本披露的抗ANGPTL3抗體或其抗原結合片段作為活性成分。

【0096】本披露中與ANGPTL3相關的疾病沒有限制，只要它是與ANGPTL3相關的疾病即可，例如利用本披露的分子誘導的治療反應可藉由結合人類ANGPTL3，然後阻遏ANGPTL3與其配體的結合。因此，當處於適於治療應用的製備物和製劑中時，本披露的分子對這樣一些人是非常有用的，他們患有高膽固醇血症、高脂血症或動脈粥樣硬化疾病等。

【0097】此外，本披露涉及用於免疫檢測或測定目標抗原（例如ANGPTL3）的方法、用於免疫檢測或測定目標抗原（例如ANGPTL3）的試劑、用於免疫檢測或測定表達目標抗原（例如ANGPTL3）的細胞的方法和用於診斷與目標抗原（例如ANGPTL3）陽性細胞相關的疾病的診斷劑，其包含本披露的特異性識別目標抗原（例如人ANGPTL3）並與胞外區的胺基酸序列或其三維結構結合的抗體或抗體片段作為活性成分。

【0098】在本披露中，用於檢測或測定目標抗原（例如ANGPTL3）的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫檢測或測定方法。

【0099】免疫檢測或測定方法是使用標記的抗原或抗體檢測或測定抗體量或抗原量的方法。免疫檢測或測定方法的實例包括放射性物質標記的免疫抗體方法（RIA）、酶免疫測定法（EIA或ELISA）、螢光免疫測定法（FIA）、發光免疫測定法、蛋白質免疫印跡法、物理化學方法等。

【0100】 上述與ANGPTL3陽性細胞相關的疾病可以藉由用本披露的抗體或抗體片段檢測或測定表達ANGPTL3的細胞來診斷。

【0101】 為了檢測表達多肽的細胞，可以使用已知的免疫檢測方法，並較佳使用免疫沉澱法、螢光細胞染色法、免疫組織染色法等。此外，可以使用利用FMAT8100HTS系統（Applied Biosystem）的螢光抗體染色法等。

【0102】 在本披露中，對用於檢測或測定目標抗原（例如ANGPTL3）的活體樣品沒有特別限制，只要它具有包含表達目標抗原（例如ANGPTL3）的細胞的可能性即可，例如組織細胞、血液、血漿、血清、胰液、尿液、糞便、組織液或培養液。

【0103】 根據所需的診斷方法，含有本披露的單株抗體或其抗體片段的診斷劑還可以含有用於執行抗原-抗體反應的試劑或用於檢測反應的試劑。用於執行抗原-抗體反應的試劑包括緩衝劑、鹽等。用於檢測的試劑包括通常用於免疫檢測或測定方法的試劑，例如識別該單株抗體、其抗體片段或其結合物的標記的第二抗體和與該標記對應的受質等。

【0104】 在以上說明書中提出了本發明一種或多種實施方式的細節。雖然可使用與本文所述類似或相同的任何方法和材料來實施或測試本發明，但是以下描述較佳的方法和材料。藉由說明書和申請專利範圍，本發明的其他特點、目的和優點將是顯而易見的。在說明書和申請專利範圍中，除非上下文中有清楚的另外指明，單數形式包括複數指代物的情況。除非另有定義，本文使用的所有技術和科學術語都具有本發明所屬領域普通技術人員所理解的一般含義。說明書中引用的所有專利和出版物都藉由引用納入。提出以下實施例是為了更

全面地說明本發明的較佳實施方式。這些實施例不應以任何方式理解為限制本發明的範圍，本發明的範圍由申請專利範圍限定。

【圖式簡單說明】

【0105】 圖1為P8BG抗體對SD（Sprague Dawley，斯潑累格·多雷）大鼠血清甘油三酯的影響；

【0106】 圖2為P3G抗體對SD大鼠血清甘油三酯的影響；

【0107】 圖3為抗ANGPTL3抗體對HFD（High-fat-diet，高脂飲食）小鼠血漿甘油三酯的影響；

【0108】 圖4為抗ANGPTL3抗體對HFD小鼠血漿低密度脂蛋白膽固醇（Low-Density Lipoprotein Cholesterol，LDL-C）的影響；

【0109】 圖5為抗ANGPTL3抗體對HFD小鼠血漿總膽固醇的影響；

【0110】 圖6為抗ANGPTL3抗體對APOE小鼠（載脂蛋白E（apolipoprotein E，ApoE）基因敲除小鼠）血漿甘油三酯的影響；

【0111】 圖7為抗ANGPTL3抗體對APOE小鼠血漿高密度脂蛋白膽固醇（High density lipotein cholesterol，HDL-C）的影響；

【0112】 圖8為抗ANGPTL3抗體在小鼠體內藥物代謝動力學實驗結果；

【0113】 圖9為抗ANGPTL3抗體在食蟹猴體內的藥物代謝動力學實驗結果。

【實施方式】

【0114】 以下結合實施例用於進一步描述本披露，但這些實施例並非限制本披露的範圍。

【0115】 本披露實施例或測試例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。參見Sambrook等，分子選殖，實驗室手冊，冷泉港實驗室；當代分子生物學方法，Ausubel等著，Greene出版協會，Wiley Interscience，NY。未註明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

實施例

實施例1、 ANGPTL3 抗原設計及表達

【0116】 以人ANGPTL3蛋白 (Uniprot號：Q9Y5C1)、小鼠ANGPTL3蛋白 (Uniprot號：Q9R182)、食蟹猴ANGPTL3蛋白 (Uniprot號：A0A2K5UDC5)、大鼠ANGPTL3蛋白 (Uniprot號：F7FHP0)作為本披露ANGPTL3的模板，設計本披露涉及的抗原及檢測用蛋白，在ANGPTL3蛋白基礎上融合不同的標籤，分別選殖到pTT5載體上 (Biovector，Cat#: 102762)，在293細胞中瞬時轉染表達、然後純化，獲得編碼本披露抗原及檢測用蛋白。

【0117】 1、人全長ANGPTL3：人-ANGPTL3(17-460)-His，可用於免疫和檢測，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQL
GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEKELRRTTYKLQVK
NEEVKNMSLELNSKLESLLKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT
FVEKQDNSIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPR
TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSP

WTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRDLGGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELED
 WKDNKHYEYSFYLGNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGH
 FNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI
 KSTKMLIHPTDSESFEHHHHHHHHHH

SEQ ID NO : 1

註釋：單下劃線部分為信號肽序列，斜體字部分為 His 序列，粗體字部分
 為人 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 460 位胺基酸。

【0118】 2、人ANGPTL3胞外區：人ANGPTL3(17-170)-Flag-His，可用於免
 疫和檢測，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQL
 GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVK
 NEEVKNMSLELNSKLESLLKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT
 FVEKGSSDYKDDDDKHHHHHH

SEQ ID NO : 2

註釋：單下劃線部分為信號肽，雙下劃線部分為連接肽，斜體部分為 Flag
 和 His，粗體字部分為人 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 170 位胺基酸。

【0119】 3、人ANGPTL3胞外區（人ANGPTL3(17-170)）與小鼠IgG2aFc段
 （縮寫：mFc）的融合蛋白：人ANGPTL3(17-170)-mFc，可用於檢測，其胺基酸
 序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPKSRFAMLDDVKILANGLLQL
 GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEKELRRTTYKLQVK
 NEEVKNMSLELNSKLESLLKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT

FVEKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSED
DPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYV
EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL
HNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO : 3

註釋：下劃線部分為信號肽，斜體部分為小鼠 IgG2aFc，粗體字部分為人 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 170 位胺基酸。

【0120】4、人ANGPTL3胞外區（人ANGPTL3(17-220)）與小鼠IgG2aFc段的融合蛋白：人ANGPTL3(17-220)-mFc，用於免疫和檢測，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRIDQDNSSFDSL***SPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQL*
GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQ*TSEIKEEEKELRRTTYKLQVK*
NEEVKNMSLELNSKLESLL*EKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSLKT*
FVEKQDNSIKDLLQ*TVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTTEISLSSKPEPRG*
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
WVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA
PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNG
KTELNYKNTEPVLDSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK
SFSRTPGK

SEQ ID NO : 4

註釋：下劃線部分為信號肽，斜體部分為小鼠 IgG2aFc，粗體字部分為人 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 220 位胺基酸。

【0121】 5、小鼠全長ANGPTL3：小鼠ANGPTL3(17-455)-His，用於免疫和檢測，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRVDPDLSSFDSAPSEP***PKSRFAMLDDVKILANGLLQL*
GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKN
EEVKNMSVELNSKLESLL*EEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGA***QEHPEVTSLKS**
FVEQQDNSIRELLQSV*EEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPS***ENSLSSKSRAP**
RTTPPLQLNETENTEQDDL*PADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQS*
GSPWTLIQHRKDGSQDFNETWENY*EKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVQQS***NYILRL**
ELQDWKDSKHVEYSFHLGSHETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSTWNHR
AKGQLYCPESYSGGWWWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRKL
YAIKSSKMMLQPTT*HHHHHHHHHHH*

SEQ ID NO : 5

註釋：下劃線部分為信號肽，斜體部分為 His 序列，粗體字部分為小鼠 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 455 位胺基酸。

【0122】 6、小鼠ANGPTL3胞外區（mouse-ANGPTL3(17-220)）與小鼠 IgG2aFc段的融合蛋白：小鼠ANGPTL3(17-220)-mFc，用於免疫，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRVDPDLSSFDSAPSEP***PKSRFAMLDDVKILANGLLQL*
GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEKELRRTTSTLQVKN
EEVKNMSVELNSKLESLL*EEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGA***QEHPEVTSLKS**

FVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPESENLS~~SSKS~~*EPR*
*GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL*MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS
 WfvnnvevhtaqtqthredynstlrVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDL*P*
 APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD*FMPEDIYVEWTNNG*
 KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK
 SFSRTPGK

SEQ ID NO : 6

註釋：下劃線部分為信號肽，斜體部分為小鼠 IgG2aFc，粗體字部分為小
 鼠 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 220 位胺基酸。

【0123】 7、食蟹猴全長ANGPTL3：食蟹猴ANGPTL3(17-460)-His，用於檢
 測，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRIDQDNSSFDSVSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQL**
GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIK~~EEEE~~KELRRTTYKLQVK
 NEEVKNMSLELNSKLESLL~~EKILLQ~~QKVKYLEEQLTNLIQNQPATPEHPEVTSLKS
 FVEKQDNSIKDLLQTV~~EEQYKQLN~~QQHSQIKEIENQLRMTNIQEPT~~EISLSSK~~PRAP
 RTTPFLQLNEIRNVKHDGIPADCTT~~TYNRGEHISGTYAIRPSNSQVFHVYCDVVSGS~~
 PWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELE
 DWKDNKH~~YIEYSFYLG~~NHETNYTLHVVKITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKG
 HFSCPE~~SYSGGWWWHDEC~~GENNLNGKYNKPRTKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSI
 KSTKMLIHPTDSESFEHHHHHHHHHHH

SEQ ID NO : 7

註釋：下劃線部分為信號肽，斜體部分為 His 序列，粗體字部分為食蟹猴 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 460 位胺基酸。

【0124】 8、大鼠全長ANGPTL3：大鼠ANGPTL3(17-455)-His，用於檢測，其胺基酸序列如下：

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLSPFDSVPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQL
GHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQCFYDLSLQTNEIKEEEKELRRTTSKLQVK
NEEVKNMSLELNSKLESLLLEEKMALQHRVRALEEQLTSLVQNPPGAREHPEVTSL
KSFVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQQHIQIKEIENQLRKTGIQEPTENSLYSKPR
APRTTPPLHLKEAKNIEQDDLPADECSAIYNRGEHTSGVYITIRPSSSQVFNVCYCDTQS
GTPRTLQHRKDGSONFNQWENYKGFGRDLGDFWLGLEKIYAIVKQSNYILRLE
LQDWKDSKHVYAEYSFHLGNHETNYTLHVAEIAANPEALPEHRDLMFSTWDHRA
KGQLYCPESYSGGWWFSDMCGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGISWRPRGGKL
YSIKSSKMMMLQPTT*HHHHHHHHHHHH*

SEQ ID NO : 8

註釋：劃橫線部分為信號肽，斜體部分為 His 序列，粗體字部分為大鼠 ANGPTL3 全長蛋白的第 17 至第 455 位胺基酸。

實施例2、ANGPTL3抗原蛋白、融合瘤抗體、重組抗體的純化

一、帶 His 標籤的重組蛋白或帶 Flag-his 標籤的重組蛋白的純化

【0125】 將細胞表達樣品高速離心去除細胞和不溶雜質，收集上清並加入咪唑至終濃度為5mM。用含有5mM咪唑的PBS溶液平衡鎳管柱，沖洗2-5倍管柱體積。將細胞上清上管柱。用含有5mM咪唑的PBS溶液沖洗管柱，至A280讀數

降至基線。然後用PBS+10mM咪唑沖洗層析管柱，除去非特異結合的雜蛋白，並收集流穿液。再用含有300mM咪唑的PBS溶液沖提目的蛋白，並收集沖提峰。

【0126】收集的沖提液用Superdex凝膠過濾管柱進行進一步精純，分管收集。所得到的樣品經過SDS-PAGE，肽圖，LC-MS鑒定為正確後分裝備用。得到帶His標籤的重組蛋白或帶Flag-his標籤的重組蛋白。

二、融合瘤抗體或帶 mFc 標籤的重組蛋白的純化

【0127】將樣品高速離心去除細胞及不溶性雜質，留上清。使用1×PBS平衡Protein A親和管柱，沖洗2-5倍管柱體積。將離心後的細胞表達上清樣品上管柱。用1×PBS沖洗管柱，至A280讀數降至基線。用1×PBS沖洗管柱。用0.1M乙酸(pH3.5-4.0)沖提目的蛋白，並收集，之後立即用1M Tris-HCl (pH 7.0) 調節沖提蛋白pH至中性，最後透析或者濃縮換液至1×PBS緩衝液中。收集樣品，經電泳、肽圖、LC-MS鑒定正確後分裝備用。得到帶mFc標籤的重組蛋白或融合瘤抗體。

三、抗體、帶 Fc 標籤的重組蛋白的純化

【0128】將樣品高速離心去除細胞及不溶性雜質，留上清。使用1×PBS平衡Protein G親和管柱，沖洗2-5倍管柱體積。將離心後的細胞表達上清樣品上管柱。用1×PBS沖洗管柱，至A280讀數降至基線。用1×PBS沖洗管柱。用乙酸(pH 3.0)沖提目的蛋白，並收集，之後立即用1M Tris-HCl (pH 7.0) 調節沖提蛋白pH至中性，最後透析或者濃縮換液至1×PBS 緩衝液中。收集樣品經電泳、肽圖、LC-MS鑒定正確後分裝備用。得到抗體或者帶hFc標籤的重組蛋白。

實施例3、抗ANGPTL3抗體的製備

一、藉由噬菌體庫篩選抗ANGPTL3人源抗體

【0129】 人源噬菌體單鏈抗體庫進行包裝濃縮，將噬菌體庫 ($10^{12} \sim 10^{13}$ /pfu) 懸浮於1ml 2%MPBS (含有2%脫脂奶粉的PBS) 中，並加入 100 μ l Dynabeads® M-280 鏈黴親和素 (Invitrogen Cat No.11206D)，置於轉檯上反復翻轉，室溫封閉1小時。將管置於磁力架上2分鐘，去除Dynabeads，噬菌體庫轉移至新的管子中。向封閉後的噬菌體庫中加入2 μ g/ml生物素標記的人 ANGPTL3(17-460)-His，置於轉檯上反復翻轉1小時。同時取100 μ l Dynabeads懸浮於1ml 2%MPBS中，置於轉檯上反復翻轉，室溫封閉1小時。將管子置於磁力架上2分鐘，吸去封閉液。將封閉後的Dynabeads加入到噬菌體庫和人 ANGPTL3(17-460)-His混合液中，置於轉檯上反復翻轉15分鐘。將管子置於磁力架上2分鐘，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)，置於轉檯上反復翻轉孵育15分鐘，進行沖提，將沖提下來的噬菌體感染大腸桿菌TG1塗平板，隨機挑取單純株，用於噬菌體ELISA。

【0130】 將純株接種於96孔深孔板 (Nunc Cat No.260251) 37度培養16~18小時。取少量接種至另一個96孔深孔板，至OD600達到0.5左右，加入M13K07輔助噬菌體 (NEB Cat No.N0315S) 進行包裝。4000g離心10分鐘去除菌體，吸取培養液進行ANGPTL3結合ELISA檢測。陽性純株菌種凍存保種並送測序公司測序。其中，測得陽性純株P3、P8對應的胺基酸序列如下：

>P3 重鏈可變區序列：

99056

第 36 頁，共 58 頁(發明說明書)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYLHWLRQAPGQGPEWWMGWISP
NSGGTSYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSDDTAVYYCARDIATLGNFFT
YGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 9

>P3 輕鏈可變區序列：

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSSWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO : 10

>P8 重鏈可變區序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR
DDSTSYAQKFOGRVTMTRDTSTSTMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY
GMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 11

>P8 輕鏈可變區序列：

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO : 12

備註：序列中下劃線部分為根據 Kabat 編號系統確定的 CDR 序列，斜體為 FR 序列。

二、抗 ANGPTL3 抗體的突變

【0131】以P8抗體的三維結構為基礎，將P8重鏈可變區的第55位胺基酸殘基（自然順序編號）由D突變為E，將P8輕鏈可變區的第34位胺基酸殘基（自然順序編號）由G突變為V，得到新的抗體分P8B，P8B的胺基酸序列如下：

>P8B 重鏈可變區序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR
EDSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY
GMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO : 13

>P8B 輕鏈可變區序列：

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNSVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPITFGQGTRLEIK

SEQ ID NO : 14

備註：序列中下劃線部分為根據 Kabat 編號系統確定的 CDR 序列，斜體為 FR 序列。

【0132】 表2.抗ANGPTL3抗體分的CDR序列

抗體分	輕鏈 CDR		重鏈 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	QQSYSSWT (SEQ ID NO : 17)	HCDR3	DIATLGNFFTYGMDV (SEQ ID NO : 20)
P8	LCDR1	RSSQSLLSHNGYTYLD (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	RSSQSLLSHNVYTYLD (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)

三、抗 ANGPTL3 抗體的構建和表達

【0133】設計引子PCR搭建抗體VH/VK基因片段，再與表達載體pHr（帶信號肽及恆定區基因(CH1-FC/CL)片段）進行同源重組，構建抗體全長表達載體VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。抗體的重鏈恆定區可選自人IgG1、IgG2、IgG4及其變體的恆定區，輕鏈恆定區可選自人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。示例性的，抗體重鏈恆定區選自序列如SEQ ID NO：29所示的人IgG4-YTE變體，輕鏈恆定區選自序列如SEQ ID NO：30所示的人 κ 鏈的恆定區。

人 IgG4-YTE 變體重鏈恆定區序列：

```
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSSFLLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
```

SEQ ID NO：29

人 κ 鏈輕鏈恆定區序列：

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

SEQ ID NO：30

【0134】 示例性地，上述輕鏈/重鏈恆定區與前述P3、P8、P8B的可變區組合形成完整的抗ANGPTL3抗體：P3G、P8G、P8BG，抗體的輕鏈/重鏈序列如下：

>P3G 重鏈序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDY¹YLHWLRQAPGQGPEWMGWISPN
NSGGTSYAQKFOGRVTMTRDTSISTA²YMELSSLRSDDTAVYYCARDIATLGNFFTY
YGMDVWGQGT³TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 31

>P3G 輕鏈序列：

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLG¹WYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 32

>P8G 重鏈序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR
DDSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY
GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD
 KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSLGK

SEQ ID NO : 33

>P8G 輕鏈序列：

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGS
NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 34

>P8BG 重鏈序列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPR
EDSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYY
GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD
 KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPE

VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSLGK

SEQ ID NO : 35

>P8BG 輕鏈序列：

*DVVM**TQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSL**LHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG*
*NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLT**FGQGTRLEIKR*
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 36

以下用生化測試方法驗證本披露的抗體的活性

測試例1.抗ANGPTL3抗體結合ANGPTL3蛋白的ELISA實驗

【0135】 抗ANGPTL3抗體藉由與ANGPTL3蛋白結合來抑制或者干擾ANGPTL3蛋白的至少一種活性。用ELISA實驗檢測抗ANGPTL3抗體與ANGPTL3抗原的結合活性。ANGPTL3蛋白(人ANGPTL3(17-170)-mFc)藉由與包被在酶標板中的羊抗鼠IgG結合從而固定到96孔酶標板中，根據抗體加入後信號的強弱判斷抗體和ANGPTL3的結合活性。同時用生物素標記試劑盒（東仁化學，LK03）標記的帶HIS標籤的ANGPTL3蛋白（小鼠ANGPTL3(17-455)-His、食蟹猴ANGPTL3(17-460)-His、大鼠ANGPTL3(17-455)-His）藉由與包被在酶標板中的鏈

徽親和素結合從而固定到96孔酶標板中，根據抗體加入後信號的強弱判斷抗體和ANGPTL3的結合活性。

【0136】 用pH7.4的PBS（上海源培，B320）緩衝液將羊抗鼠IgG（Sigma,M3534-1ML）稀釋至2 μ g/ml濃度，以50 μ l/孔的體積加入96孔酶標板（Corning,CLS3590-100EA）中，於37 $^{\circ}$ C 孵育箱中放置3小時或4 $^{\circ}$ C 放置過夜（16-18小時）。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶（BD，232100）封閉液250 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育3小時或4 $^{\circ}$ C 放置過夜（16-18小時）進行封閉。封閉結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液（pH7.4 PBS含0.05%吐溫-20）洗板3次後，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液（pH7.4PBS含1%BSA）稀釋至0.5 μ g/ml 人ANGPTL3(17-170)-mFc（序列如SEQ ID NO：3）置37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小時。孵育結束後，棄去酶標板中的反應液，用PBST洗板3次後，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體，放於37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育2小時。孵育結束後用PBST洗板3次，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的羊抗人二抗（Jackson Immuno Research,109-035-003），37 $^{\circ}$ C 孵育1小時。用PBST洗板3次後，加入50 μ l/孔TMB顯色受質（KPL,52-00-03），於室溫孵育2-5分鐘（min），加入50 μ l/孔1MH₂SO₄終止反應，用VersaMax酶標儀在450nm處讀取吸收值，計算抗ANGPTL3抗體對ANGPTL3抗原蛋白的結合的EC50值。實驗結果見表3。

【0137】 用pH7.4的PBS（上海源培，B320）緩衝液將鏈徽親和素（Sigma,S4762-5MG）稀釋至3 μ g/ml濃度，以50 μ l/孔的體積加入96孔酶標板（Corning,CLS3590-100EA）中，於37 $^{\circ}$ C 孵育箱中放置3小時或4 $^{\circ}$ C 放置過夜（16-18小時）。棄去液體後，加入用PBS稀釋的5%脫脂牛奶（BD，232100）封閉液250 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育箱孵育3小時或4 $^{\circ}$ C 放置過夜（16-18小時）進行封閉。封閉

結束後，棄去封閉液，並用PBST緩衝液（pH7.4PBS含0.05%吐溫-20）洗板3次後，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液（pH7.4PBS含1%BSA）稀釋至0.5 μ g/ml的生物素標記的小鼠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小時。孵育結束後，棄去酶標板中的反應液，用PBST洗板3次後，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體，放於37 $^{\circ}$ C孵育箱孵育2小時。孵育結束後用PBST洗板3次，加入50 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的HRP標記的羊抗鼠二抗（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偶聯的二抗（義翹神州，Cat No. 11973-MM05-100，用於噬菌體篩選），37 $^{\circ}$ C孵育1小時。用PBST洗板3次後，加入50 μ l/孔TMB顯色受質（KPL,52-00-03），於室溫孵育2-5分鐘（min），加入50 μ l/孔1MH₂SO₄終止反應，用VersaMax酶標儀在450nm處讀取吸收值，計算抗ANGPTL3抗體對ANGPTL3抗原蛋白的結合的EC50值。實驗結果見表3，實驗結果顯示，本披露的抗ANGPTL3抗體能夠結合不同種屬的ANGPTL3蛋白。

【0138】表3. 抗ANGPTL3抗體與不同種屬ANGPTL3蛋白結合ELISA實驗

抗體	與人 ANGPTL3 結合 EC50(nM)	與小鼠 ANGPTL3 結合 EC50(nM)	與食蟹猴 ANGPTL3 結合 EC50(nM)	與大鼠 ANGPTL3 結合 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

測試例2. 抗ANGPTL3抗體與ANGPTL3抗原蛋白的HTRF結合實驗

【0139】 HTRF實驗同樣被用來檢測抗ANGPTL3抗體與抗原的結合活性。用生物素標記試劑盒（東仁化學，LK03）標記的帶HIS標籤的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）與HTRF試劑Streptavidin-Tb cryptata（Cisbio，610SATLA）結合，抗體加入後，抗體會分別與HTRF試劑Pab 抗小鼠IgG-XL665（Cisbio，61PAMXLA）以及血管生成素樣蛋白3結合，信號的強弱被用於判斷抗體和血管生成素樣蛋白3的結合活性。

【0140】 用稀釋液（pH7.4PBS含1%BSA）配置4 μ g/ml的生物素標記的人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 μ l/孔加入到384孔板中（PerkinElmer，optiplate-384），然後加入5 μ l/孔的HTRF試劑Streptavidin-Tb cryptata以及Pab抗鼠IgG-XL665的混合液，最後加入10 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體，放在25 $^{\circ}$ C 孵育1小時。用PHERAstar FS（BMG LabTECH）在HTRF模塊讀取數值，計算抗ANGPTL3抗體對血管生成素樣蛋白3的結合EC50值。實驗結果見表4，實施結果表明，本披露的抗體對人、小鼠、食蟹猴、大鼠等種屬的ANGPTL3抗原均具有良好的結合活性。

【0141】 表4.抗ANGPTL3抗體與ANGPTL3蛋白的HTRF結合實驗

抗體	與 ANGPTL3 蛋白結合的 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

測試例3. 抗ANGPTL3抗體抑制LPL 的酶活實驗

【0142】 LPL的酶活檢測實驗用來檢測抗ANGPTL3抗體阻斷ANGPTL3蛋白對LPL酶抑制作用的活性。

【0143】 用稀釋緩衝液(pH7.4PBS+2mg/ml BSA) 稀釋牛LPL(Sigma, L2254-5KU)到12.5 單位，25 μ l/孔加入到96孔板中 (Corning, 3603)，然後加入25 μ l/孔用樣品稀釋液稀釋的不同濃度待測抗體，再加入25 μ l/孔濃度為27.6 μ 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))，將96孔板在振盪器上振盪混勻，37 $^{\circ}$ C培養箱中孵育30min。最後加入25 μ l/孔用稀釋緩衝液稀釋的20 μ M的受質 (Sigma, 30058-10MG-F)，將96孔板在振盪器上振盪混勻，37 $^{\circ}$ C培養箱中孵育30min。在Flexstation3 酶標儀以Ex535/Em612讀數。用Graphpad Prism 5軟體處理濃度和對應螢光值數據，並計算IC50。實驗結果見表5，實施結果表明，本披露的抗體具有良好的LPL酶抑制作用。

【0144】表5. 抗ANGPTL3抗體阻斷不同種屬ANGPTL3抑制LPL的活性實驗

結果

抗體	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

測試例4. 抗ANGPTL3抗體與ANGPTL3 蛋白的Biacore檢測實驗

【0145】用Biacore測定待測抗ANGPTL3抗體和人、猴、大鼠及小鼠ANGPTL3的親和力。方法如下：

【0146】分別用Protein A生物傳感芯片（Cat. # 29127556, GE）親和捕獲一定量的待測抗體，然後於芯片表面流經一定濃度的人、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儀器實時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線。在每個循環解離完成後，使用pH1.5的甘胺酸-鹽酸再生溶液（Cat. # BR-1003-54, GE）將生物芯片洗淨再生。試驗運行緩衝液為1×HBS-EP緩衝溶液（Cat. # BR-1001-88，GE）。試驗得到的數據用GE Biacore T200評估軟體3.0版本以（1:1）Langmuir模型進行擬合，得出親和力數值。實驗結果見表6，實驗結果表明，本披露的抗ANGPTL3抗體能與人、食蟹猴、大鼠及小鼠的ANGPTL3抗原以高親和力結合。

【0147】表6. 抗ANGPTL3抗體與ANGPTL3蛋白的Biacore檢測實驗結果

抗體	抗原	結合常數 (1/Ms)	解離常數 (1/s)	親和力 (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

測試例5. 抗ANGPTL3抗體大鼠體內藥效評價

一、P8BG 抗體在大鼠體內降脂實驗

【0148】實驗用SD大鼠於實驗室環境適應性飼養1週(4週齡SD大鼠，

SPF，100 g左右，雄性，購自上海斯萊克實驗動物有限責任公司。合格證號：

20170005013017, SCXK (滬) 2017-0005), 給予12/12小時光/暗週期調節, 溫度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 濕度40~50%, 動物均給予標準滅菌鼠飼料, 自由進食飲水。在實驗開始前7天, 動物禁食4h後眼眶採血, 3500 RPM離心15 min, 取血清。利用ADVIA 2400化學系統 (Siemens) 測定血清脂質濃度 (甘油三酯)。將大鼠按甘油三酯水平分6組 (非相關同型人IgG蛋白 (hIgG, 以下同) 作為陰性對照組、Evinacumab (序列結構參見WHO Drug Information, Vol. 29, No. 3, 2015中的Evinacumab序列) 3.5mpk組、Evinacumab7mpk組、P8BG3.5mpk組、P8BG1.75mpk組、P8BG7mpk組), 每組6隻大鼠, 皮下注射給藥一次, 於注射後第1天、第5天、第9天、第13天和第16天將各組大鼠禁食4小時後採血分離血清, 用ADVIA 2400化學系統 (Siemens) 測定血清脂質濃度 (甘油三酯)。實驗數據表示為平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SEM), 並Graphpad Prism5軟體作圖, 採用TTEST進行統計學分析。

【0149】實驗結果見圖1及表7所示, 與陰性對照組相比, 給藥1天後, 各治療組甘油三酯均下降, 除了Evinacumab3.5 mpk組, 其餘各組均有統計差異, 實驗過程中, P8BG7 mpk組的甘油三酯最大下降83.7%, P8BG3.5 mpk組甘油三酯最大下降81.8%, P8BG1.75 mpk組甘油三酯最大下降68.7%; 給藥5天後, P8BG3.5mpk組、P8BG1.75mpk組、P8BG7mpk組組甘油三酯下降仍有統計差異, 而Evinacumab3.5mpk組、Evinacumab7mpk組無統計差異; 給藥9天後, P8BG7 mpk組和P8BG3.5 mpk組仍有統計差異。這說明, 同一劑量下P8BG比Evinacumab的降甘油三酯效果更好也更為持久。而且實驗過程中各組動物體重正常。

【0150】表7. P8BG抗體對大鼠血清甘油三酯的影響

抗體	Evinacumab		P8BG		
	7mpk	3.5mpk	7mpk	3.5mpk	1.75mpk
皮下給藥劑量	7mpk	3.5mpk	7mpk	3.5mpk	1.75mpk
開始 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%

備註：Max Inh %表示相對於陰性對照組 TG 的最大降脂百分比，mpk 表示 mg/kg。

二、P3G 抗體在大鼠體內降脂實驗

【0151】實驗用SD大鼠於實驗室環境適應性飼養1週(4週齡SD大鼠，SPF，雄性，購自上海斯萊克實驗動物有限責任公司。合格證號：20170005013017，SCXK（滬）2017-0005)，給予12/12小時光/暗週期調節，溫度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，濕度40~50%，動物均給予標準滅菌鼠飼料，自由進食飲水。在實驗開始前7天，動物禁食4h後眼眶採血，3500 RPM離心15 min，取血清。利用ADVIA 2400化學系統（Siemens）測定血清脂質濃度（甘油三酯）。將大鼠按甘油三酯水平分4組（hIgG陰性對照組、Evinacumab3.5mpk組、P3G3.5mpk組、P3G7mpk組），每組6隻大鼠，皮下注射給藥一次，於注射後第1天、第5天、第9天和第13天將各組大鼠禁食4小時後採血分離血清，用ADVIA 2400化學系統（Siemens）測定血清脂質濃度（甘油三酯）。實驗數據表示為平均值±標準差（Mean±SEM），並用Graphpad Prism5軟體作圖，採用TTEST進行統計學分析。

【0152】 實驗結果見圖2所示，與hIgG陰性對照組相比，給藥1天後各組甘油三酯均下降，且P3G3.5mpk組、P3G7mpk組甘油三酯降幅大於Evinacumab 3.5mpk組；給藥9天後，P3G3.5mpk組和P3G7mpk組血清脂質濃度仍低於陽性對照。

測試例6. 在高脂高膽固醇餵養c57bl/6小鼠中測定抗ANGPTL3抗體對血漿脂質濃度的體內效應

【0153】 c57bl/6小鼠按5隻/籠飼養(4週齡c57bl/6小鼠，SPF，16-18g左右，雄性，購自上海卡文斯實驗動物有限責任公司。合格證號：201913812，SCXK(蘇)2016-0010)，於實驗室環境適應性飼養4週，給予12/12小時光/暗週期調節，溫度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，濕度40~50%，動物均給予普通飼料餵養，自由進食飲水。預採血5天後將普通飼料換成高脂高膽固醇飼料(D12079B，購自：江蘇省協同醫藥生物工程有限責任公司)餵養小鼠，直到實驗結束。在實驗開始前8天為動物禁食，禁食4小時後眼眶採血，8000RPM離心2min，收集血漿。利用ADVIA 2400化學系統(Siemens)測定血漿脂質濃度。將小鼠按甘油三酯水平分為4組(hIgG陰性對照組、Evinacumab25mpk組、P8BG25mpk組、P8BG5mpk組)，每組11隻，皮下給藥，每週注射一次，共給藥8次。於實驗開始後第2週、3週、5週、7週、9週、10週和11週時，將各組小鼠禁食4小時後眼眶採血並收集血漿。利用ADVIA 2400化學系統(Siemens)測定血漿脂質濃度(甘油三酯(TG)、總膽固醇(TC)以及LDL膽固醇(LDL-C))。實驗數據表示為平均值 \pm 標準差(Mean \pm SEM)，並用Graphpad Prism5軟體作圖，採用TTEST進行統計學分析。

【0154】 實驗結果見表8至表10和圖3-至圖5所示，與hIgG陰性對照組相比，實驗第2週、3週、5週及7週後P8BG 25 mpk組的TG、TC及LDL-C均顯著下降；Evinacumab25 mpk及P8BG5 mpk組在實驗3週、5週及7週後TG、TC及LDL-C下降。實驗9週後，與hIgG陰性對照組相比，只有P8BG25 mpk和P8BG5 mpk兩組甘油三酯顯著下降。與Evinacumab25 mpk組相比，實驗第2週、第3週、第9週、P8BG25 mpk組的甘油三酯及總膽固醇均顯著下降；與Evinacumab25 mpk組相比，實驗第2週、第9週、P8BG25 mpk組的LDL-C顯著下降。在第一至第11週的整個實驗週期中，Evinacumab25 mpk組TG最低降至 40.5 ± 2.3 ，與開始TG相比下降了32.60%；而P8BG25 mpk組TG最低降至 21.1 ± 1.3 ，與開始TG相比下降了64.90%。這說明，P8BG抗體比Evinacumab的降血脂效果更為有效且持久。

【0155】 表8.抗ANGPTL3抗體對c57bl/6小鼠血漿TG的影響

抗體	Evinacumab	P8BG		hIgG
	25mpk	25mpk	5mpk	25mpk
皮下每週 給藥劑量	25mpk	25mpk	5mpk	25mpk
開始 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%

備註：max Inh %表示相對於開始 TG 的最大降脂百分比

【0156】表9.抗ANGPTL3抗體對c57b1/6小鼠血漿LDL的影響

抗體	Evinacumab	P8BG	
皮下每週給藥劑量	25mpk	25mpk	5mpk
Max Inh %	28.10%	52.10%	42.80%

備註：Max Inh %表示相對於陰性對照組 LDL 的最大降脂百分比

【0157】表10.抗ANGPTL3抗體對c57b1/6小鼠血漿TC的影響

抗體	Evinacumab	P8BG	
皮下每週給藥劑量	25mpk	25mpk	5mpk
Max Inh %	27.50%	47.90%	36.20%

備註：Max Inh %表示相對於陰性對照組 TC 的最大降脂百分比

測試例7. 在APOE小鼠中測定抗ANGPTL3抗體對血漿脂質濃度的體內效應

【0158】 APOE小鼠按2隻/籠飼養(8週齡APOE小鼠，SPF，22g左右，雄性，購自上海卡文斯實驗動物有限責任公司。合格證號：201917260，SCXK(蘇)2016-0010)，於實驗室環境適應性飼養4週，給予12/12小時光/暗週期調節，溫度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，濕度40~50%，動物均給予高脂飼料(D12108C)飼養，自由進食飲水。在實驗開始前7天為動物禁食，禁食4小時(h)後眼眶採血，8000RPM離心2分鐘(min)，收集血漿。利用ADVIA 2400化學系統(Siemens)測定血漿脂質濃度。將小鼠按甘油三酯水平分為5組(hIgG陰性對照組、Evinacumab10mpk組、Evinacumab5mpk組、P8BG10mpk組、P8BG5mpk組)，每組8隻，分別皮下注射給藥一次(各組給藥劑量見表11)，給藥後的第1天

(d)、第7天及第11天分別將各組小鼠禁食4小時後眼眶採血，收集血漿，利用ADVIA 2400化學系統 (Siemens) 測定血漿脂質濃度 (甘油三酯、HDL膽固醇)。實驗數據表示為平均值±標準差 (Mean±SEM)，並用Graphpad Prism5軟體作圖，採用TTEST進行統計學分析。

【0159】 本次實驗結果見圖6、7和表11所示，與hIgG陰性對照組相比，給藥1d後，各治療組甘油三酯均下降，Evinacumab (10mpk) 組甘油三酯最低降至 $65.6\pm 5.4\text{mg/dL}$ ，與開始TG值相比下降了46.2%，Evinacumab (5mpk) 組甘油三酯最低降至 $71.8\pm 3.3\text{mg/dL}$ ，與開始TG值相比下降了42.1%，P8BG (10mpk) 組甘油三酯最低降至 $33.3\pm 2.2\text{mg/dL}$ ，與開始TG值相比下降了72.9%，P8BG (5mpk) 組甘油三酯最低降至 $37.0\pm 1.7\text{mg/dL}$ ，與開始TG值相比下降了70.2%。另外，實驗結果顯示，給藥1天後P8BG10mpk組的血漿HDL-C有所升高，Evinacumab10mpk組血漿HDL-C下降，而在降脂實驗中，通常並不希望降脂的同時引起HDL-C的下降。

【0160】 表11.抗ANGPTL3抗體對APOE小鼠血漿甘油三酯的影響

抗體	Evinacumab		P8BG		hIgG
	10mpk	5mpk	10mpk	5mpk	
皮下給藥劑量	10mpk	5mpk	10mpk	5mpk	10mpk
開始 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%

備註：max Inh %表示相對於開始 TG 的最大降脂百分比

測試例8. 抗ANGPTL3抗體藥物代謝動力學評價

一、抗ANGPTL3抗體小鼠體內藥物代謝動力學實驗

【0161】 體重18-24g的C57BL/6小鼠（購自浙江維通利華實驗動物技術有限公司）。實驗室環境適應性飼養不小於3天，12/12小時光/暗週期調節，溫度16-26℃，相對濕度40-70%，飼養期間自由攝取飼料和水。實驗開始前一天，對C57BL/6小鼠進行編號，隨機分組，每組3隻。實驗當天，每組小鼠分別靜脈注射受試藥物P8BG和Evinacumab，給藥劑量為10 mg/kg；注射體積均為5 ml/kg。

【0162】 給藥組於給藥前及給藥後5min、8h、1 d、2 d、4 d、7 d、10d、14 d、21 d、28d採集全血0.1 ml，不加抗凝，取血後在4℃放置30min，1000g離心15 min，取上清(血清)置於EP管中,於-80℃保存。

【0163】 採用ELISA方法檢測血清中的抗體濃度，採用Winnolin軟體計算受試藥物的藥動學參數。所得主要藥動學結果見表12和圖8。實驗結果表明本披露的P8BG抗體在小鼠體內的半衰期高於陽性對照Evinacumab。

【0164】 表12.抗ANGPTL3抗體在小鼠藥物代謝動力學

抗體	P8BG	Evinacumab
給藥方式	i.v.	i.v.
給藥劑量(mg/kg)	10	10
t _{1/2h}	131.4±18.8	71.1±6.1
t _{1/2d}	5.47±0.78	2.96±0.25
AUC _{0-∞} (h*ug/ml)	23272±2887	16904±4481

備註： AUC_{0-∞}：藥時曲線下面積；t_{1/2}(h)：半衰期（以小時為單位）；
t_{1/2}(d)：半衰期（以天為單位）；i.v.靜脈內注射。

二、抗ANGPTL3抗體在食蟹猴體內的藥物代謝動力學評價

【0165】 使用體重3-4kg的食蟹猴（購自廣東前沿生物科技有限公司）。動物轉入實驗前至少進行14天的檢疫馴養。動物飼養於不銹鋼籠具中，每組每籠不超過2隻。動物房的室溫控制在18°C~26°C，相對濕度在40%~70%，光照12小時明暗交替。實驗過程中動物自由攝水。根據生化指標將6隻食蟹猴中隨機分成2組，每組3隻動物。每組分別皮下注射受試藥物P8BG和Evinacumab，給藥劑量為10 mg/kg；注射體積均為2 ml/kg。

【0166】 分組後動物禁食過夜，分別於給藥前、給藥開始後1小時（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於下肢靜脈取血2 mL左右，置含分離膠的採血管中，取血後於室溫放置30分鐘（min），1000 g離心15 min，取上清分裝於2個乾淨的EP管中，-70°C以下暫存（採血後2 h內完成）。採用ELISA方法檢測血清中的抗體濃度，採用Winnolin軟體計算受試藥物的藥動學參數。所得主要藥動學結果見表14和圖9。實驗結果表明本披露的P8BG抗體在食蟹猴體內的半衰期高於陽性對照Evinacumab。

【0167】 表13.抗ANGPTL3抗體在食蟹猴藥物代謝動力學

	P8BG	Evinacumab
給藥劑量 (mg/kg)	10	10
給藥方式	sc.	sc.
t1/2h	324.7±115.3	157.7±28.6
t1/2d	13.5±4.8	6.6±1.2
AUC 0-∞ (ug/ml*h)	44243±7404	38027±252

備註： AUC 0-∞：藥時曲線下面積；t1/2(h)：半衰期（以小時為單位）；
t1/2(d)：半衰期（以天為單位）；sc.皮下注射。

【符號說明】

無。

【序列表】

<110> 江蘇恆瑞醫藥股份有限公司(JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.)
上海恆瑞醫藥有限公司(SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)

<120> 抗 ANGPTL3 抗體及其應用(ANTI-ANGPTL3 ANTIBODY AND USAGE THEREOF)

<130> 721011CPCT

<150> CN202010073192.4
<151> 2020-01-22

<160> 36

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1
<211> 473
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 結構域
<223> 人 ANGPTL3 (17-460)-His 序列

<400> 1
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu
20 25 30
Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
35 40 45
Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
50 55 60
His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
65 70 75 80
Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys
85 90 95
Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys
100 105 110
Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
115 120 125
Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
130 135 140
Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu
145 150 155 160
His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn
165 170 175
Ser Ile Lys Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu
180 185 190
Asn Gln Gln His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg
195 200 205
Thr Ser Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg
210 215 220
Ala Pro Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val

100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gly Ser Ser
 165 170 175
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His His His His His His
 180 185 190

<210> 3
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> 人 ANGPTL3(17-170)-mFc 序列

<400> 3
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu
 20 25 30
 Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 50 55 60
 His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Glu Pro Arg
 165 170 175
 Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 180 185 190
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 195 200 205
 Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 210 215 220
 Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 245 250 255
 Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp


```

          195                200                205
Thr Ser Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Glu
  210                215                220
Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
225                230                235                240
Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
          245                250                255
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
          260                265                270
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
          275                280                285
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
  290                295                300
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
305                310                315                320
Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
          325                330                335
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
          340                345                350
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
          355                360                365
Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
  370                375                380
Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
385                390                395                400
Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
          405                410                415
Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
          420                425                430
Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
          435                440                445
Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
  450                455

```

<210> 5
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> 小鼠 ANGPTL3 (17-455)-His 序列

```

<400> 5
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1                5                10                15
Val Gln Cys Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala
          20                25                30
Pro Ser Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
          35                40                45
Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
          50                55                60
His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65                70                75                80
Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys

```


<221> 結構域

<223> 小鼠 ANGPTL3 (17-220)-mFc 序列

<400> 6

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala
 20 25 30
 Pro Ser Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 50 55 60
 His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn
 165 170 175
 Ser Ile Arg Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
 180 185 190
 Ser Gln Gln His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys
 195 200 205
 Thr Gly Ile Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Glu
 210 215 220
 Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
 245 250 255
 Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
 275 280 285
 Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
 340 345 350
 Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
 370 375 380
 Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr

405 410 415
 Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 435 440 445
 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455

<210> 7
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> 食蟹猴 ANGPTL3 (17-460)-His 序列

<400> 7
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Val
 20 25 30
 Ser Pro Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
 35 40 45
 Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
 50 55 60
 His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
 65 70 75 80
 Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys
 85 90 95
 Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys
 100 105 110
 Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu
 130 135 140
 Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Ala Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn
 165 170 175
 Ser Ile Lys Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
 180 185 190
 Asn Gln Gln His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Met
 195 200 205
 Thr Asn Ile Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg
 210 215 220
 Ala Pro Arg Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val
 225 230 235 240
 Lys His Asp Gly Ile Pro Ala Asp Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly
 245 250 255
 Glu His Ile Ser Gly Thr Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val
 260 265 270
 Phe His Val Tyr Cys Asp Val Val Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile
 275 280 285
 Gln His Arg Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn

165 170 175
 Ser Ile Arg Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
 180 185 190
 Ser Gln Gln His Ile Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Lys
 195 200 205
 Thr Gly Ile Gln Glu Pro Thr Glu Asn Ser Leu Tyr Ser Lys Pro Arg
 210 215 220
 Ala Pro Arg Thr Thr Pro Pro Leu His Leu Lys Glu Ala Lys Asn Ile
 225 230 235 240
 Glu Gln Asp Asp Leu Pro Ala Asp Cys Ser Ala Ile Tyr Asn Arg Gly
 245 250 255
 Glu His Thr Ser Gly Val Tyr Thr Ile Arg Pro Ser Ser Ser Gln Val
 260 265 270
 Phe Asn Val Tyr Cys Asp Thr Gln Ser Gly Thr Pro Arg Thr Leu Ile
 275 280 285
 Gln His Arg Lys Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Gln Thr Trp Glu Asn
 290 295 300
 Tyr Glu Lys Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Lys Ile Tyr Ala Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Ile Leu Arg Leu
 325 330 335
 Glu Leu Gln Asp Trp Lys Asp Ser Lys His Tyr Ala Glu Tyr Ser Phe
 340 345 350
 His Leu Gly Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Val Ala Glu Ile
 355 360 365
 Ala Ala Asn Ile Pro Glu Ala Leu Pro Glu His Arg Asp Leu Met Phe
 370 375 380
 Ser Thr Trp Asp His Arg Ala Lys Gly Gln Leu Tyr Cys Pro Glu Ser
 385 390 395 400
 Tyr Ser Gly Gly Trp Trp Phe Ser Asp Met Cys Gly Glu Asn Asn Leu
 405 410 415
 Asn Gly Lys Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg
 420 425 430
 Arg Gly Ile Ser Trp Arg Pro Arg Gly Gly Lys Leu Tyr Ser Ile Lys
 435 440 445
 Ser Ser Lys Met Met Leu Gln Pro Thr Thr His His His His His
 450 455 460
 His His His His
 465

<210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> P3 重鏈可變區序列

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met

50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Gly Ser Ile Arg Glu Val Leu Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> P8 輕鏈可變區序列

<400> 12
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> P8B 重鏈可變區序列

<400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Arg Glu Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met Tyr

<400> 16

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域

<223> P3 的 LCDR3 序列

<400> 17

Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Trp Thr
1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域

<223> P3 的 HCDR1 序列

<400> 18

Asp Tyr Tyr Leu His
1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域

<223> P3 的 HCDR2 序列

<400> 19

Trp Ile Ser Pro Asn Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域
 <223> P3 的 HCDR3 序列

<400> 20
 Asp Ile Ala Thr Leu Gly Asn Phe Phe Thr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> P8 的 LCDR1 序列

<400> 21
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> P8/P8B 的 LCDR2 序列

<400> 22
 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 結構域
 <223> P8/P8B 的 LCDR3 序列

<400> 23
 Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域
<223> P8/P8B 的 HCDR1 序列

<400> 24
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 結構域
<223> P8 的 HCDR2 序列

<400> 25
Leu Ile Asn Pro Arg Asp Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 結構域
<223> P8/P8B 的 HCDR3 序列

<400> 26
Asp Leu Gly Ser Ile Arg Glu Val Leu Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 結構域
<223> P8B 的 LCDR1 序列

<400> 27
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Val Tyr Thr Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域

<223> P8B 的 HCDR2 序列

<400> 28

Leu Ile Asn Pro Arg Glu Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 29

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 結構域

<223> 人 IgG4-YTE 變體重鏈恆定區序列

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

<221> 鏈

<223> P3G 輕鏈序列

<400> 32

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 33

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 鏈

<223> P8G 重鏈序列

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Arg Asp Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

				85						90				95	
Ala	Arg	Asp	Leu	Gly	Ser	Ile	Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
			100					105					110		
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
		115					120						125		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu
		130				135					140				
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145				150						155				160	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165						170				175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185						190	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser
	210					215					220				
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly
225					230					235				240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr
				245						250				255	
Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
			260					265						270	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295						300			
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
305					310					315				320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile
			325							330				335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340					345						350	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		355					360						365		
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
		370				375					380				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
385					390					395				400	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val
				405						410				415	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			420					425						430	
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
		435					440							445	
Leu	Gly	Lys													
	450														

<210> 34
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 鏈
 <223> P8G 輕鏈序列

<400> 34

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 35

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 鏈

<223> P8BG 重鏈序列

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Leu Ile Asn Pro Arg Glu Asp Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Met Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Gly Ser Ile Arg Glu Val Leu Tyr Tyr Gly Met Asp

	100						105						110			
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	
	115						120					125				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	
	130					135					140					
Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
145				150					155					160		
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
				165					170					175		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
				180				185						190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	
	195						200					205				
Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	
210						215					220					
Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	
225					230					235				240		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	
				245					250					255		
Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	
				260				265						270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	275						280					285				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	
290						295						300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	
				325					330					335		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340					345						350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		355					360					365				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	370					375					380					
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
385					390					395					400	
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	
				405					410					415		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			420					425						430		
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	435						440							445		
Leu	Gly	Lys														
	450															

<210> 36
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 鏈
 <223> P8BG 輕鏈序列

<400> 36

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Val Tyr Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其包含抗體重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

iv) 該重鏈可變區包含序列分別如 SEQ ID NO：24、SEQ ID NO：28 和 SEQ ID NO：26 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，該輕鏈可變區包含序列分別如 SEQ ID NO：27、SEQ ID NO：22 和 SEQ ID NO：23 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或者

vi) 該重鏈可變區包含序列分別如 SEQ ID NO：18、SEQ ID NO：19 和 SEQ ID NO：20 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，該輕鏈可變區包含序列分別如 SEQ ID NO：15、SEQ ID NO：16 和 SEQ ID NO：17 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【請求項2】 如請求項 1 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區和輕鏈可變區，其中，

(A) 該重鏈可變區與 SEQ ID NO：13 具有至少 90%序列同一性，和/或該輕鏈可變區與 SEQ ID NO：14 具有至少 90%序列同一性；或者

(C) 該重鏈可變區與 SEQ ID NO：9 具有至少 90%序列同一性，和/或該輕鏈可變區與 SEQ ID NO：10 具有至少 90%序列同一性。

【請求項3】 如請求項 1 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其包含如下所示的重鏈可變區和輕鏈可變區：

(D) 序列如 SEQ ID NO:13 所示的重鏈可變區，和序列如 SEQ ID NO：14 所示的輕鏈可變區；或者

(F) 序列如 SEQ ID NO:9 所示的重鏈可變區，和序列如 SEQ ID NO：10 所示的輕鏈可變區。

【請求項4】 如請求項 1 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其中該抗 ANGPTL3 抗體進一步包含重鏈恆定區和輕鏈恆定區。

【請求項5】 如請求項 4 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈恆定區選自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恆定區，該輕鏈恆定區選自人 κ 和 λ 鏈恆定區。

【請求項6】 如請求項 5 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其中該重鏈恆定區，其序列如 SEQ ID NO:29 所示或與 SEQ ID NO:29 具有至少 85%序列同一性，和/或該輕鏈恆定區，其序列如 SEQ ID NO:30 所示或與 SEQ ID NO:30 具有至少 85%序列同一性。

【請求項7】 如請求項 1 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其中該抗 ANGPTL3 抗體包含重鏈和輕鏈，其中，

(G) 該重鏈與 SEQ ID NO：35 具有至少 85%序列同一性，和/或該輕鏈與 SEQ ID NO：36 具有至少 85%序列同一性；或

(I) 該重鏈與 SEQ ID NO：31 具有至少 85%序列同一性，和/或該輕鏈與 SEQ ID NO：32 具有至少 85%序列同一性。

【請求項8】 如請求項 1 所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，其中該抗 ANGPTL3 抗體包含重鏈和輕鏈，其中，

(J) 該重鏈如 SEQ ID NO：35 所示，和該輕鏈如 SEQ ID NO：36 所示；或

(L) 該重鏈如 SEQ ID NO：31 所示，和該輕鏈如 SEQ ID NO：32 所示。

【請求項9】 一種核酸分子，其編碼如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段。

【請求項10】 一種宿主細胞，其包含如請求項 9 所述的核酸分子。

【請求項11】 一種醫藥組成物，其含有：

(A) 治療有效量的如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，或如請求項 9 所述的核酸分子，以及

(B) 一種或更多種藥學上可接受的載體、稀釋劑、緩衝劑或賦形劑。

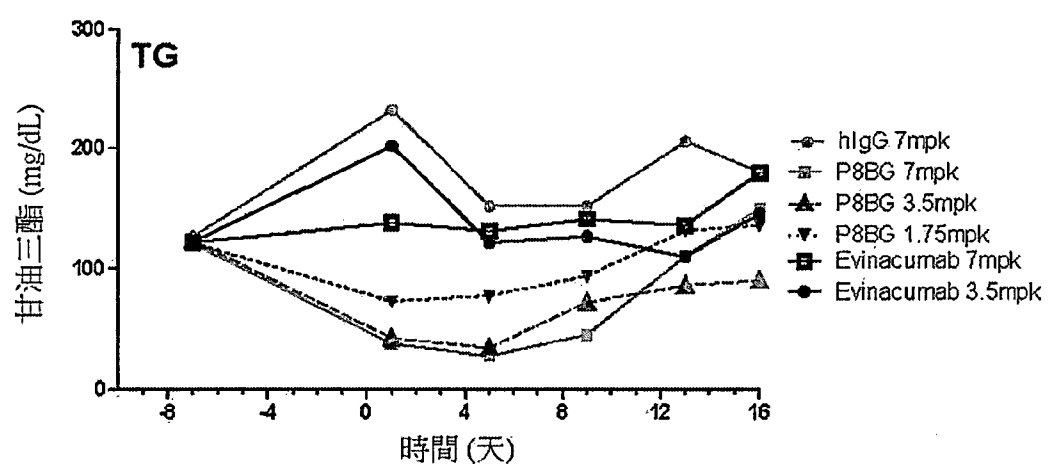
【請求項12】 一種用於免疫檢測或測定 ANGPTL3 的方法，該方法包括使用如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段的步驟。

【請求項13】 一種試劑盒，其包含如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段。

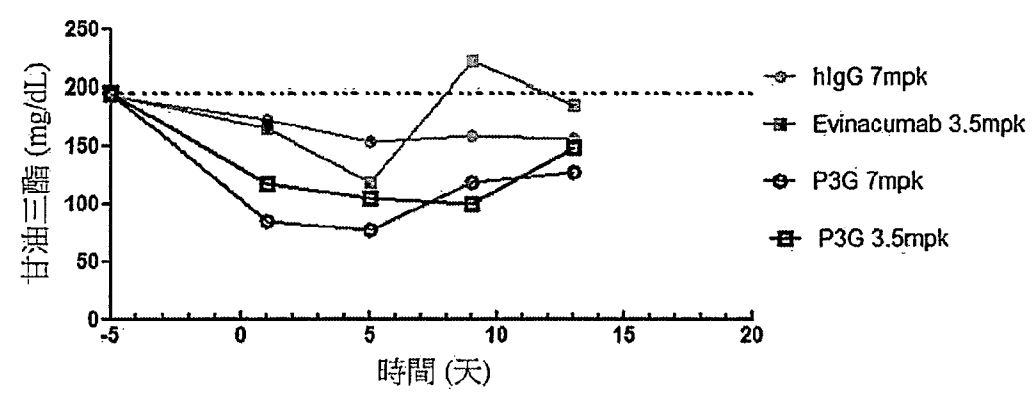
【請求項14】 一種如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗 ANGPTL3 抗體或其抗原結合片段，或如請求項 9 所述的核酸分子，或如請求項 11 所述的醫藥組成物在製備用於治療疾病或病症的藥物中的用途，其中，該疾病或病症為 ANGPTL3 相關的疾病或病症。

【請求項15】 如請求項14所述的用途，其中，該疾病或病症為高膽固醇血症、高脂血症或動脈粥樣硬化疾病。

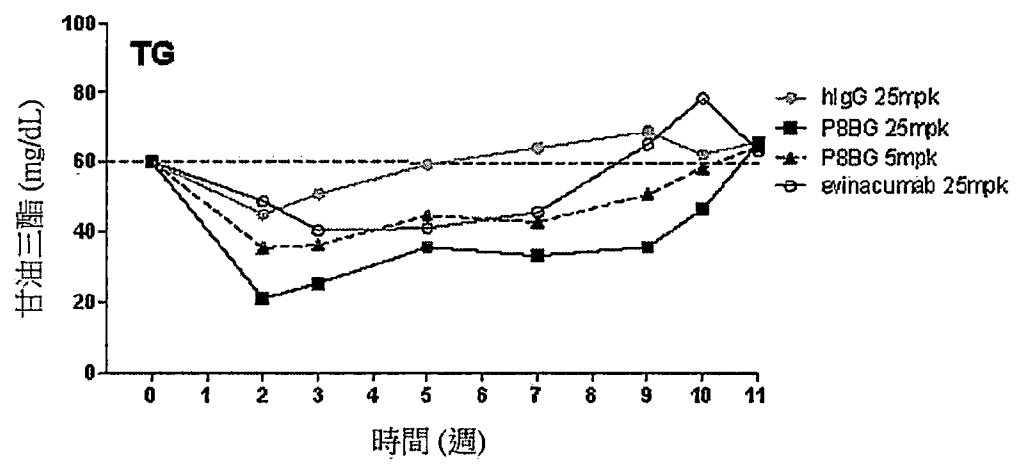
【發明圖式】



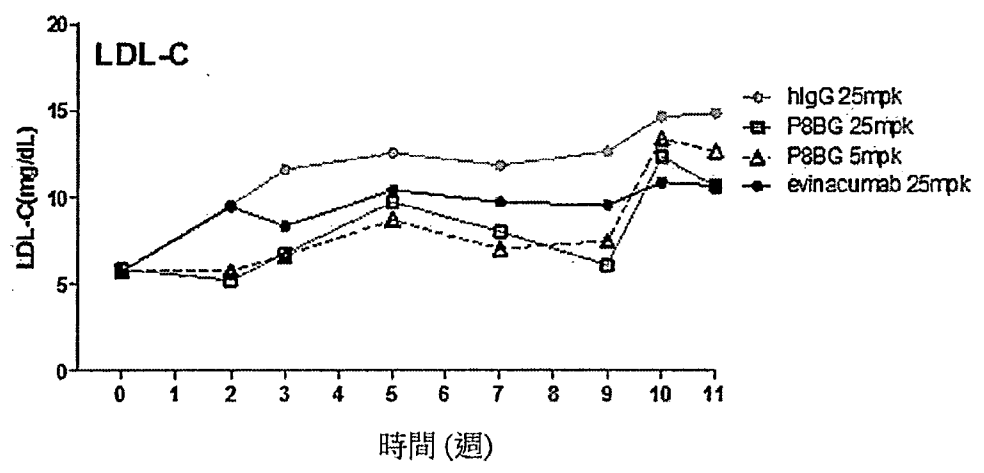
【圖1】



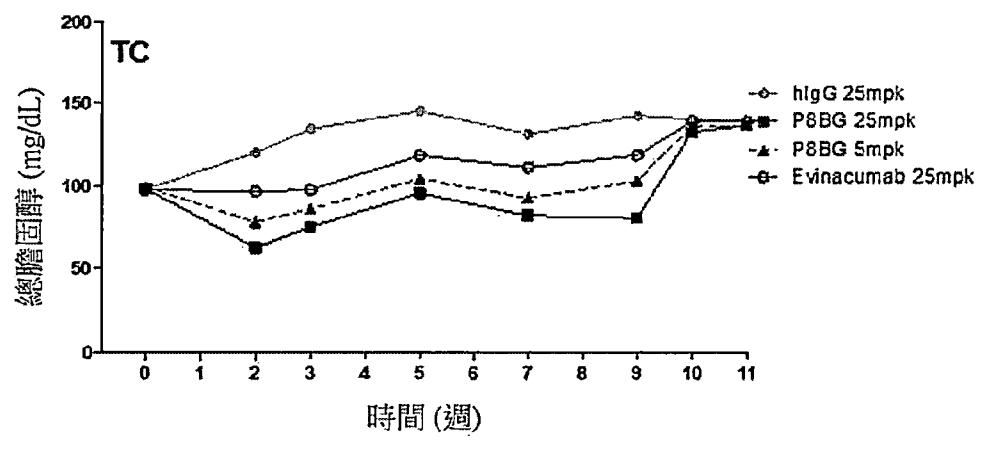
【圖2】



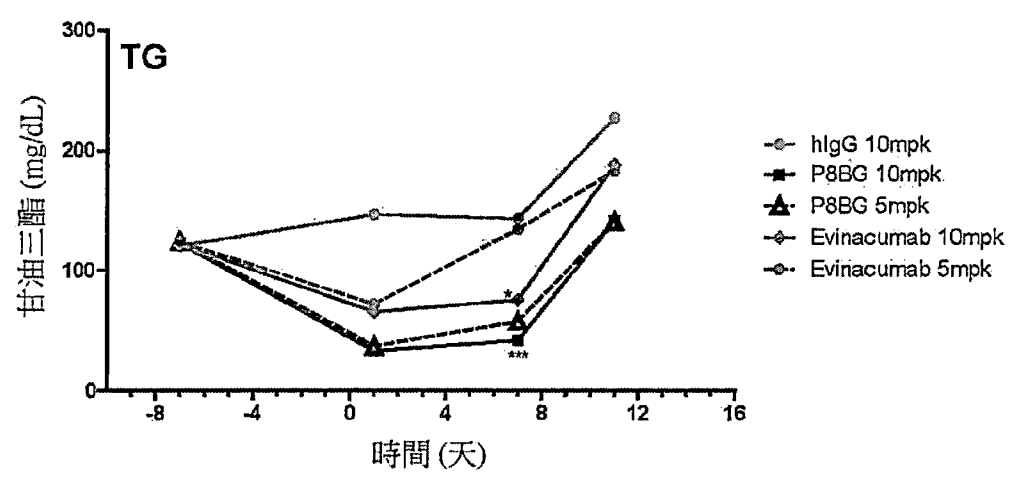
【圖3】



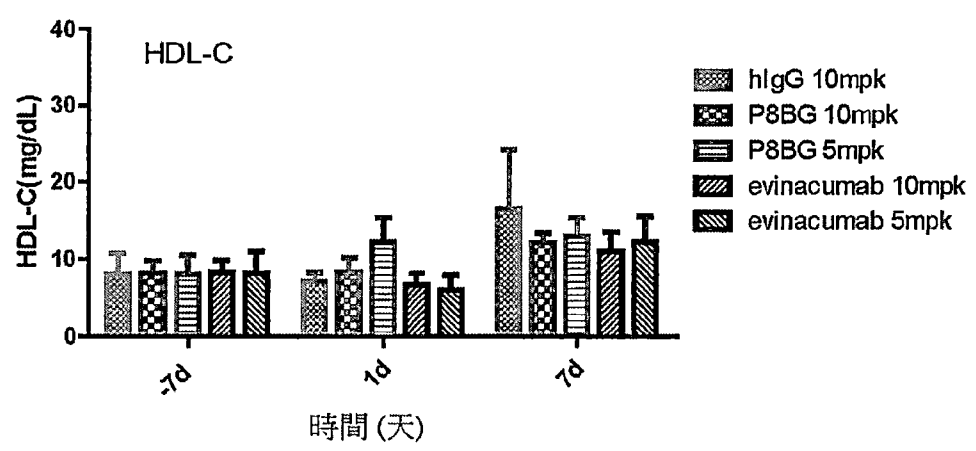
【圖4】



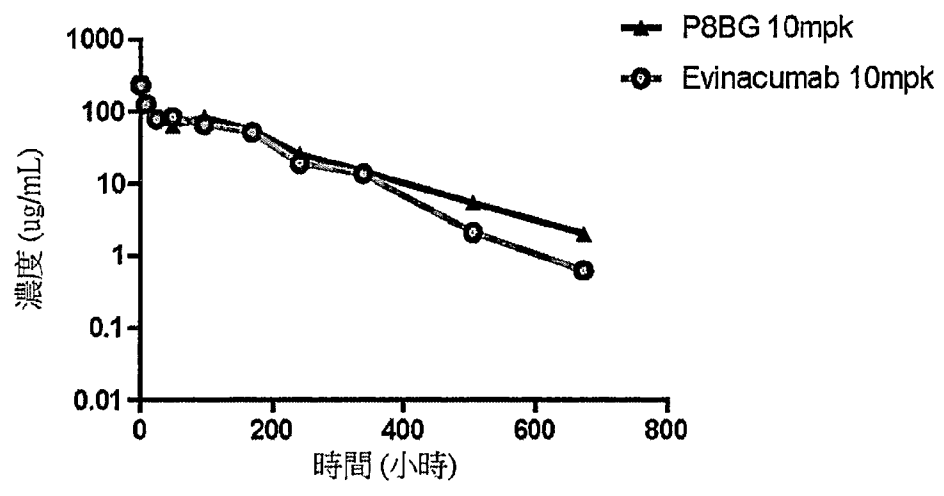
【圖5】



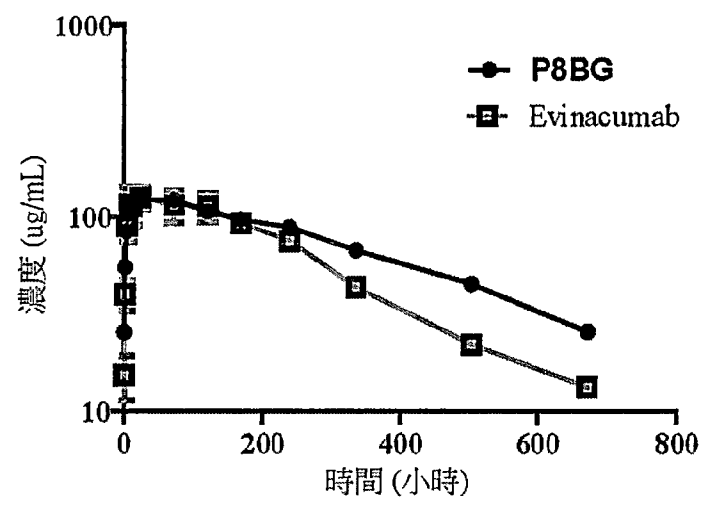
【圖6】



【圖7】



【圖8】



【圖9】