

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490204 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.15

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

(22) Дата подачи заявки
2022.07.21

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ANGPTL3 ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ФРАГМЕНТА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110822526.8

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.21

Ян Сицинъ, Гэ Линсяо, Ван Хунвэй
(CN)

(33) CN

(86) PCT/CN2022/106993

(74) Представитель:

(87) WO 2023/001228 2023.01.26

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(57) Фармацевтическая композиция антитела против ANGPTL3 (ангиопоэтин-подобный белок 3) или его антигенсвязывающего фрагмента и ее применение. В частности, данная фармацевтическая композиция содержит антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент и буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия. Данная фармацевтическая композиция также может содержать сахар и поверхностно-активное вещество. Данная фармацевтическая композиция имеет хорошую стабильность антитела.

A1

202490204

202490204

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ANGPTL3 ИЛИ ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕГО ФРАГМЕНТА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

В настоящей заявке испрашивается приоритет китайской патентной заявки
5 № 202110822526.8, поданной 21 июля 2021 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее раскрытие относится к области фармацевтических препаратов и,
10 в частности, к фармацевтической композиции, содержащей антитело против
ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, и к ее фармацевтическому
применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15

ангиопозэтин-подобный белок 3 (ANGPTL3), представляет собой
секретируемый белок, и в качестве члена семейства белков, подобных
ангиопозэтину, он, главным образом, экспрессируется в печени. Аминоконцевая
спиральная область ANGPTL3 ассоциирована с ингибированием активности
20 липопротеинлипазы (LPL), и модуляция карбоксиконцевых фибриногенподобных
областей триглицеридов (TG), главным образом, ассоциирована с модуляцией
ангиогенеза. Таким образом, данный белок имеет функцию осуществления
модуляции метаболизма липидов и стимуляции ангиогенеза.

ANGPTL3 служит, главным образом, для модуляции метаболизма
25 липопротеинов и, посредством ингибирования LPL и эндотелиальной липазы (EL),
играет роль в модулировании метаболизма липидов. В настоящее время
ингибиторы ANGPTL3 попадают в 2 категории, одна из которых представляет
собой ANGPTL3-ASO (антисмысловые олигонуклеотиды), а другая –
моноклональные антитела против ANGPTL3, такие как эвинакумаб. Их механизмы
30 и места действия отличаются: ANGPTL3-ASO, главным образом, действует на
гепатоциты, тогда как эвинакумаб действует в системе кровообращения. Однако
ингибирование ANGPTL3 либо на фенотипическом, либо на генетическом уровне
имеет примечательный и стабильный эффект снижения уровня липидов.
Моноклональные антитела подтипа IgG4, которые нацелены на ANGPTL3, могут
35 связываться с ANGPTL3 и, посредством блокирования связывания ANGPTL3 с
LPL, устранять ингибирование активности фермента LPL посредством ANGPTL3 и

стимулировать деградацию триглицеридов в плазме крови, осуществляя посредством этого цель лечения гиперлипидемии.

В WO2021147984A предложено антитело против ANGPTL3 и его антигенсвязывающий фрагмент с лучшим и более продолжительным эффектом снижения уровня липидов. Лекарственные средства на основе антител из-за их большой молекулярной массы и сложных структур склонны к деградации, агрегации, нежелательным химическим модификациям и т.д., что делает их нестабильными. Особенно важно разрабатывать стабильные препараты лекарственных средств на основе антител, которые делают антитела более подходящими для введения, сохраняют антитела стабильными во время хранения и последующего применения и заставляют антитела продуцировать лучшие терапевтические эффекты. Таким образом, существует потребность в разработке относительно стабильных композиций антител против ANGPTL3 и их антигенсвязывающих фрагментов. Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ANGPTL3 и его антигенсвязывающий фрагмент, которая является достаточно стабильной, имеет хорошую морфологию при лиофилизации и является более подходящей для введения.

20 КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент и буфер. Также согласно настоящему раскрытию предложен способ лечения и предупреждения заболевания с использованием данной фармацевтической композиции и ее фармацевтическое применение.

В некоторых воплощениях вышеупомянутый буфер выбран из любого из следующих: ацетатный буфер, гистидиновый буфер, фосфатный буфер, сукцинатный буфер и буфер на основе лимонной кислоты, например, из ацетатного буфера.

В некоторых воплощениях вышеупомянутый буфер выбран из группы, состоящей из любого из следующих буферов: уксусная кислота-ацетат натрия, гистидина гидрохлорид, натрия дигидрофосфат-динатрия гидрофосфат, янтарная кислота-натрия сукцинат и лимонная кислота-натрия цитрат, например, из буфера на основе уксусной кислоты-ацетата натрия.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где: данная переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области тяжелой цепи аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 9, и/или данная переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 10. CDR определяются согласно схеме нумерации Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact. В некоторых конкретных воплощениях CDR определяются согласно схеме нумерации Kabat.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где: данная переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, аминокислотная последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 14; HCDR2, аминокислотная последовательность которой представляет собой LINPRDDSTSYAQKFQG (SEQ ID NO: 23); и HCDR3, аминокислотная последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 16; и/или переменная область легкой цепи содержит LCDR1, аминокислотная последовательность которой представляет собой RSSQSLLHSNGYTYLD (SEQ ID NO: 24); LCDR2, аминокислотная последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 12; и LCDR3, аминокислотная последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 13.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где: данная переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 переменной области тяжелой цепи аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 17, и/или данная переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 переменной области легкой цепи аминокислотной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 18. CDR определяются согласно схеме нумерации Kabat, IMGT, Chothia, AbM или Contact. В некоторых конкретных воплощениях CDR определяются согласно схеме нумерации Kabat.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит

вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела, где: данная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, соответственно; и/или данная вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции выбрано из группы, состоящей из мышинового антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела; в некоторых конкретных воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых воплощениях последовательности FR легкой и тяжелой цепи в вариабельных областях легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела против ANGPTL3 в фармацевтической композиции происходят из FR легкой и тяжелой цепи человеческой зародышевой линии или их мутировавших последовательностей соответственно.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела, где: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 9 или имеет по меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную или большую идентичность последовательности с ней, и/или аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 10 или имеет по меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную или большую идентичность последовательности с ней.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела, где: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 17 или имеет по меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную или большую идентичность последовательности с ней, и/или аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 18 или имеет по

меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную или большую идентичность последовательности с ней.

В настоящем раскрытии «по меньшей мере 90%-ная и большая идентичность последовательности» охватывает по меньшей мере 90%-ную, по 5 меньшей мере 91%-ную, по меньшей мере 92%-ную, по меньшей мере 93%-ную, по меньшей мере 94%-ную, по меньшей мере 95%-ную, по меньшей мере 96%-ную, по меньшей мере 97%-ную, по меньшей мере 98%-ную, по меньшей мере 99%-ную и большую идентичность последовательности.

10 В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 10.

15 В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 17, и аминокислотная последовательность 20 переменной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 18.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи. В альтернативных воплощениях константная область тяжелой цепи происходит из константных областей 25 человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и константная область легкой цепи происходит из константных областей человеческой цепи κ и λ .

В некоторых воплощениях аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 19 или имеет по 30 меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную и большую идентичность последовательности с ней, и/или аминокислотная последовательность константной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 20 или имеет по меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную и большую идентичность последовательности с ней.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его 35 антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 21 или

имеет по меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную и большую идентичность последовательности с ней, и/или аминокислотная последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 22 или имеет по меньшей мере 80%-ную, по меньшей мере 85%-ную, по меньшей мере 90%-ную и большую идентичность последовательности с ней.

В некоторых воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент в фармацевтической композиции содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 21, и аминокислотная последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 22.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент, описанный в настоящем раскрытии, выбран из группы, состоящей из следующих: Fab, F(ab')₂, Fab', Fd, Fv, dsFv, scFv, Fab и биспецифичные антитела.

В некоторых воплощениях буфер в фармацевтической композиции имеет pH от 4,0 до 7,0, например, от 4,0 до 6,9, от 4,0 до 6,8, от 4,0 до 6,7, от 4,0 до 6,6, от 4,0 до 6,5, от 4,0 до 6,4, от 4,0 до 6,3, от 4,0 до 6,2, от 4,0 до 6,1, от 4,0 до 6,0, от 4,0 до 5,9, от 4,0 до 5,8, от 4,0 до 5,7, от 4,0 до 5,6, от 4,0 до 5,5, от 4,5 до 6,5, от 4,5 до 6,0, от 4,5 до 5,5, от 5,0 до 7,0, от 5,0 до 6,5, от 5,0 до 6,0, от 5,0 до 5,5, от 4,6 до 6,6, от 4,6 до 6,5, от 4,6 до 6,4, от 4,6 до 6,3, от 4,6 до 6,2, от 4,6 до 6,1, от 4,6 до 6,0, от 4,6 до 5,9, от 4,6 до 5,8, от 4,6 до 5,7, от 4,6 до 5,6, от 4,6 до 5,5, от 4,6 до 5,4, от 4,8 до 6,6, от 4,8 до 6,5, от 4,8 до 6,4, от 4,8 до 6,3, от 4,8 до 6,2, от 4,8 до 6,1, от 4,8 до 6,0, от 4,8 до 5,9, от 4,8 до 5,8, от 4,8 до 5,7, от 4,8 до 5,6, от 4,8 до 5,5, от 4,8 до 5,4, от 4,9 до 5,4 или от 5,0 до 5,4; в некоторых конкретных воплощениях данный буфер имеет pH примерно 4,0, примерно 4,1, примерно 4,2, примерно 4,3, примерно 4,4, примерно 4,5, примерно 4,6, примерно 4,7, примерно 4,8, примерно 4,9, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3, примерно 5,4, примерно 5,5, примерно 5,6, примерно 5,7, примерно 5,8, примерно 5,9, примерно 6,0, примерно 6,5, примерно 6,6, примерно 6,7, примерно 6,8, примерно 6,9 или примерно 7,0, например, примерно 5,2.

В некоторых воплощениях концентрация буфера в данной фармацевтической композиции составляет от 5 мМ до 40 мМ, например, от 5 мМ до 30 мМ, от 5 мМ до 20 мМ, от 5 мМ до 15 мМ, от 5 мМ до 10 мМ, от 10 мМ до 15 мМ или от 8 мМ до 12 мМ; в некоторых конкретных воплощениях концентрация буфера составляет примерно 5 мМ, примерно 6 мМ, примерно 7 мМ, примерно 8 мМ, примерно 9 мМ, примерно 10 мМ, примерно 11 мМ, примерно 12 мМ, примерно

13 мМ, примерно 14 мМ, примерно 15 мМ, примерно 18 мМ или примерно 20 мМ, например, примерно 10 мМ.

В некоторых воплощениях концентрация антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента в фармацевтической композиции составляет от 5 10 мг/мл до 200 мг/мл, например, от 50 мг/мл до 200 мг/мл, от 50 мг/мл до 150 мг/мл, от 60 мг/мл до 150 мг/мл, от 60 мг/мл до 120 мг/мл, от 80 мг/мл до 150 мг/мл, от 80 мг/мл до 120 мг/мл, от 90 мг/мл до 120 мг/мл или от 90 мг/мл до 110 мг/мл; в некоторых конкретных воплощениях концентрация антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента составляет примерно 10 мг/мл, примерно 20 10 мг/мл, примерно 30 мг/мл, примерно 50 мг/мл, примерно 60 мг/мл, примерно 65 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 75 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 85 мг/мл, примерно 90 мг/мл, примерно 95 мг/мл, примерно 100 мг/мл, примерно 105 мг/мл, примерно 110 мг/мл, примерно 115 мг/мл, примерно 120 мг/мл, примерно 130 мг/мл, примерно 140 мг/мл, примерно 150 мг/мл, примерно 160 мг/мл, 15 примерно 170 мг/мл, примерно 180 мг/мл, примерно 190 мг/мл, примерно 200 мг/мл или любое значение между любыми двумя из данных значений, например, примерно 100 мг/мл.

В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество в данной фармацевтической композиции может быть выбрано из группы, состоящей из 20 полисорбата 20, полисорбата 80, поллоксамера, Triton, натрия додецилсульфоната, натрия лаурилсульфоната, натрия октилгликозида, лаурил-сульфобетаина, миристил-сульфобетаина, линолеил-сульфобетаина, стеарил-сульфобетаина, лаурил-саркозина, миристил-саркозина, линолеил-саркозина, стеарил-саркозина, линолеил-бетаина, миристил-бетаина, цетил-бетаина, лаурамидпропил-бетаина, 25 кокарамидпропилбетаина, линолеинамидпропилбетаина, миристиламидпропилбетаина, пальмитамидпропилбетаина, изостеарамидпропилбетаина, миристиламидпропил-диметиламина, пальмитамидпропил-диметиламина, изостеарамидпропил-диметиламина, натрия метилкокоила, натрия метилолеилтаурата, полиэтиленгликоля, 30 полипропиленгликоля, сополимера этилен- и пропиленгликоля и тому подобных. В некоторых конкретных воплощениях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20, например, полисорбат 80.

В некоторых воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества в данной фармацевтической композиции составляет от 0,05 мг/мл до 0,6 мг/мл, 35 например, от 0,1 мг/мл до 0,6 мг/мл, от 0,1 мг/мл до 0,5 мг/мл или от 0,1 мг/мл до 0,4 мг/мл, например, от 0,1 мг/мл до 0,3 мг/мл; в некоторых конкретных

воплощениях концентрация поверхностно-активного вещества в данной фармацевтической композиции составляет примерно 0,1 мг/мл, примерно 0,15 мг/мл, примерно 0,2 мг/мл, примерно 0,25 мг/мл, примерно 0,3 мг/мл, примерно 0,4 мг/мл, примерно 0,5 мг/мл или примерно 0,6 мг/мл, например, примерно 0,2 мг/мл.

5 В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция дополнительно содержит стабилизатор. В альтернативных воплощениях данный стабилизатор выбран из группы, состоящей из сахара и аминокислоты. В альтернативных воплощениях данный сахар включает общий состав $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O})_n$ и его производные, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахароспирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и тому подобные. В альтернативных воплощениях данный сахар может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, декстрана, глицерина, эритритола, глицерина, арабитола, ксилозы, сорбита, маннита, меллибиозы, мелецитозы, раффинозы, маннотриозы, стахиозы, мальтозы, лактулозы, мальтулозы, глюцитолола, мальтитолола, лактитолола, изо-мальтулозы и тому подобных. В некоторых конкретных воплощениях данный сахар представляет собой невосстанавливающий дисахарид, такой как сахароза. В некоторых конкретных воплощениях аминокислота выбрана из группы, состоящей из глицина, метионина и пролина. В некоторых воплощениях концентрация сахара в данной фармацевтической композиции составляет от 40 мг/мл до 110 мг/мл, например, от 40 мг/мл до 95 мг/мл, от 60 мг/мл до 90 мг/мл, от 60 мг/мл до 80 мг/мл, от 70 мг/мл до 90 мг/мл или от 70 мг/мл до 80 мг/мл; в некоторых конкретных воплощениях концентрация сахара составляет примерно 60 мг/мл, примерно 65 мг/мл, примерно 70 мг/мл, примерно 75 мг/мл, примерно 80 мг/мл, примерно 85 мг/мл, примерно 90 мг/мл или любое значение между двумя из данных значений, например, примерно 75 мг/мл.

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

- 30 (a) от 10 мг/мл до 200 мг/мл (например, примерно 50 мг/мл) антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента и
- (b) примерно 10 мМ гистидин-гистидингидрохлоридный буфер;
- возможно данная фармацевтическая композиция имеет pH от 6,0 до 6,6 (например, примерно 6,0 или примерно 6,6).

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

35

(a) от 10 мг/мл до 200 мг/мл (например, примерно 50 мг/мл) антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента и

(b) примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия;
возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 4,6 до 5,0
5 (например, примерно 4,6 или примерно 5,0).

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) от 10 мг/мл до 200 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента и

10 (b) 5 мМ – 30 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия).

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 10 мг/мл до 200 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

15 (b) 5 мМ – 30 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия),

(c) от 40 мг/мл до 90 мг/мл сахара (например, сахарозы) и

(d) от 0,05 мг/мл до 0,6 мг/мл поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 80 или полисорбата 20);

20 возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 4,5 до 6,5, например, от 5,0 до 5,4, например, примерно 5,2.

Согласно настоящему раскрытию предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) от 10 мг/мл до 200 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, и

25 (b) 5 мМ – 20 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия);

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,5.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

30 (a) от 50 мг/мл до 150 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) 5 мМ – 15 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия),

(c) от 60 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

35 (d) от 0,05 мг/мл до 0,5 мг/мл полисорбата 80;

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 6,0.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 40 мг/мл до 120 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

5 (b) 5 мМ – 15 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия),

(c) от 60 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

(d) от 0,1 мг/мл до 0,4 мг/мл полисорбата 80;

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,8.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

10 (a) от 80 мг/мл до 120 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) 5 мМ – 15 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия),

(c) от 70 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

15 (d) от 0,1 мг/мл до 0,3 мг/мл полисорбата 80;

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,5.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 80 мг/мл до 120 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

20 (b) 5 мМ – 15 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия),

(c) от 70 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

(d) от 0,1 мг/мл до 0,3 мг/мл полисорбата 80;

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,5.

25 В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

(a) от 90 мг/мл до 110 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) 8 мМ – 12 мМ ацетатный буфер (например, буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия),

30 (c) от 75 мг/мл до 85 мг/мл сахарозы и

(d) от 0,15 мг/мл до 0,25 мг/мл полисорбата 80;

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,1 до 5,3.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

(a) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

35 (b) 5 мМ – 15 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия,

(с) от 60 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

(d) от 0,1 мг/мл до 0,4 мг/мл полисорбата 80;

возможно данная фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,4.

В некоторых конкретных воплощениях данная фармацевтическая композиция содержит:

(1) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,1 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(2) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(3) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,4 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(4) примерно 80 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(5) примерно 120 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(6) примерно 150 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(7) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 60 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(8) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 65 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(9) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 70 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(10) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 80 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(11) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 90 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 10 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4);

(12) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 5 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4); или

(13) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента, примерно 75 мг/мл сахарозы, примерно 0,2 мг/мл полисорбата 80 и примерно 15 мМ буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия, причем рН составляет от 5,0 до 5,4 (например, примерно 5,0, примерно 5,1, примерно 5,2, примерно 5,3 или примерно 5,4).

В приведенных выше воплощениях антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из следующих:

5 1) антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO:13, соответственно; и переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO:16 соответственно;

10 2) антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO:17, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO:
15 18;

3) антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 21, и аминокислотная последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 22;

20 4) антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, соответственно; и переменная область тяжелой цепи
25 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO:16 соответственно; и

30 5) антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, где аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 9, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO:
35 10.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем раскрытии, уже имеет достаточную стабильность для приготовления в лекарственное средство и
35 может храниться в стабильном состоянии в течение длительного времени. Фармацевтическая композиция по настоящему раскрытию по меньшей мере имеет

преимущество наличия хорошей стабильности, хорошей морфологии при лиофилизации и т.д.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция остается стабильной при 2-8°C в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6
5 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция остается стабильной при 25°C в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых воплощениях данная
10 фармацевтическая композиция остается стабильной при 40°C в течение по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 14 суток или по меньшей мере 28 суток.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция остается стабильной после встряхивания при 200 об./мин при комнатной температуре в течение по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере
15 36 часов, по меньшей мере 48 часов или по меньшей мере 60 часов.

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция остается стабильной после по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 циклов замораживания-оттаивания (-35°C/комнатная температура).

В некоторых воплощениях данная фармацевтическая композиция остается стабильной после воздействия света (5000 лк) при 25°C в течение по меньшей мере 1 суток, по меньшей мере 2 суток, по меньшей мере 3 суток, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 8 суток, по меньшей мере 9 суток, по меньшей мере
25 мере 10 суток, по меньшей мере 11 суток или по меньшей мере 12 суток.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ получения вышеупомянутой фармацевтической композиции, включающий стадию подвергания маточного раствора антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента замене буфера, где данный буфер может
30 представлять собой буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия.

В некоторых воплощениях вышеупомянутая фармацевтическая композиция представляет собой жидкий препарат. В некоторых других воплощениях вышеупомянутая фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированный препарат.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ получения лиофилизированного препарата, содержащего антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий стадию лиофилизации вышеупомянутой фармацевтической композиции. В
5 альтернативных воплощениях осуществление лиофилизации включает последовательные стадии предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен лиофилизированный препарат, содержащий антитело против ANGPTL3 или его
10 антигенсвязывающий фрагмент, полученный вышеупомянутым способом получения лиофилизированного препарата.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ получения восстановленного раствора из лиофилизированного препарата, содержащего антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент,
15 включающий стадию восстановления вышеупомянутого лиофилизированного препарата, где раствор, используемый для восстановления, выбран из группы, состоящей из воды для инъекции, нормального физиологического раствора и раствора глюкозы, но не ограничивающейся ими.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен восстановленный раствор, содержащий антитело против ANGPTL3 или его
20 антигенсвязывающий фрагмент, полученный вышеупомянутым способом получения восстановленного раствора.

Согласно настоящему раскрытию предложено изделие, продукт или набор, содержащие любую из вышеупомянутых фармацевтических композиций, жидких
25 пепаратов, лиофилизированных препаратов или восстановленных растворов, содержащих антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему раскрытию. В качестве альтернативы, данное изделие, продукт или набор дополнительно содержит один или более чем один контейнер, где данные контейнеры содержат любую из вышеупомянутых фармацевтических композиций,
30 жидких пепаратов, лиофилизированных препаратов или восстановленных растворов по настоящему раскрытию. В некоторых воплощениях данные контейнеры представляют собой стеклянные флаконы, например, инъекционные флаконы, сделанные из трубок нейтрального борсиликатного стекла.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложено изделие,
35 содержащее контейнер, где данный контейнер содержит вышеупомянутую

фармацевтическую композицию или лиофилизированный препарат, или восстановленный раствор данного лиофилизированного препарата.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложена фармацевтическая композиция или лиофилизированный препарат, или
5 восстановленный раствор данного лиофилизированного препарата для применения в способах лечения и предупреждения заболеваний или расстройств.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложено применение вышеупомянутой фармацевтической композиции или лиофилизированного
10 препарата, или восстановленного раствора данного лиофилизированного препарата для получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения заболеваний или расстройств.

Согласно настоящему раскрытию дополнительно предложен способ
лечения и/или предупреждения заболевания или расстройства, включающий
введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически и/или профилактически
15 эффективного количества вышеупомянутой фармацевтической композиции или лиофилизированного препарата, или восстановленного раствора данного лиофилизированного препарата. В некоторых воплощениях данный субъект представляет собой человеческого субъекта.

В некоторых воплощениях данное заболевание или расстройство
20 представляет собой любое заболевание или расстройство, ассоциированное с активностью ANGPTL3, включая заболевания или расстройства, опосредованные ANGPTL3.

В некоторых воплощениях примеры данного заболевания или расстройства
включают заболевания или расстройства, включающие липидный метаболизм,
25 такие как гиперлипидемия, гиперлипопротеинемия и дислипидемия, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях примеры данного заболевания или расстройства включают атеросклеротическую дислипидемию, диабетическую дислипидемию, гипертриглицеридемию (включая тяжелую гипертриглицеридемию, TG (триглицериды) больше 1000 мг/дл), гиперхолестеринемию, хиломикронемию,
30 смешанную дислипидемию (например, ожирение, метаболический синдром или диабет), липодистрофию, липоатрофию и тому подобные, но не ограничиваются ими. В некоторых воплощениях примерами заболевания или расстройства могут быть дислипидемия, вызванная пониженной активностью LPL, недостаточностью LPL, пониженной активностью рецептора LDL (LDLR), недостаточностью рецептора LDL (например, LDLR^{-/-} гомозиготная наследственная гиперхолестеринемия),
35 измененной недостаточностью ApoC2/ApoE, повышенным ApoB, пониженной

продукцией и/или устранением липопротеина очень низкой плотности (VLDL), некоторыми лекарственными средствами (например, дислипидемия, вызванная лечением глюкокортикоидами), любой генетической предрасположенностью, диетой, стилем жизни и т.д.

5 В некоторых воплощениях данное заболевание или расстройство может представлять собой заболевание или расстройство, ассоциированное с или вызванное гиперлипидемией, гиперлипопротеинемией и/или дислипидемией, включая сердечно-сосудистые заболевания или расстройства, такие как атеросклероз, аневризма, гипертензия, стенокардия, инсульт, заболевания сосудов
10 мозга, застойная сердечная недостаточность, заболевание коронарных артерий, инфаркт миокарда и заболевание периферических сосудов; острый панкреатит; неалкогольный стеатогепатит (NASH); отклонения содержания глюкозы в крови, такие как диабет и ожирение, но не ограничиваясь ими.

В некоторых воплощениях другие примеры заболевания или расстройства
15 включают рак/опухоли и заболевания или расстройства, связанные с неопухолевым ангиогенезом. В альтернативных воплощениях заболевание или расстройство может представлять собой глазное заболевание или расстройство, связанные с ангиогенезом, такое как возрастная макулодистрофия, окклюзия центральной вены или ветвей вены сетчатки, диабетическая ретинопатия или
20 ретинопатия недоношенных. В альтернативных воплощениях данное заболевание или расстройство может представлять собой воспалительное заболевание или расстройство, такое как артрит, ревматоидный артрит (RA) или псориаз.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

25

ФИГ. 1: влияние антитела P8BG на сывороточные триглицериды у крыс SD (Sprague Dawley).

ФИГ. 2: влияние антител против ANGPTL3 на триглицериды плазмы у мышей на диете с высоким содержанием жиров (HFD).

30

ФИГ. 3: влияние антител против ANGPTL3 на холестерин липопротеина низкой плотности плазмы у HFD мышей.

ФИГ. 4: влияние антител против ANGPTL3 на общий холестерин плазмы у HFD мышей.

35

ФИГ. 5: влияние антител против ANGPTL3 на триглицериды плазмы у APOE мышей (мышь, нокаутированная по гену аполипопротеина E (ApoE)).

ФИГ. 6: влияние антител против ANGPTL3 на холестерин липопротеина высокой плотности (HDL-C) плазмы у APOE мышей.

ФИГ. 7: результаты по фармакокинетике антител против ANGPTL3 у мышей.

5 ФИГ. 8: результаты по фармакокинетике антител против ANGPTL3 у яванских макаков.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Терминология

10 Для того, чтобы облегчить понимание настоящего изобретения некоторые технические и научные термины конкретно определяются ниже. Если в данном документе конкретно не определено иначе, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения, обычно понятные обычным специалистам в области, к которой относится настоящее раскрытие.

15 Термин «буфер» относится к буферу, который сопротивляется изменениям рН посредством действия его компонентов сопряженной пары кислота-основание. Примеры буферов, которые поддерживают рН в пределах подходящего интервала, включают ацетатный, сукцинатный, цитратный, фосфатный, глюконатный, на основе соли гистидина, оксалатный, лактатный, фосфатный, цитратный, 20 тартратный, фумаратный, глицил-глициновый буферы и буферы на основе других органических кислот.

«Буфер на основе соли гистидина» представляет собой буфер, содержащий ионы гистидина. Примеры буферов на основе соли гистидина включают гистидин- 25 гидрохлоридные буферы, гистидин-ацетатные буферы, гистидин-фосфатные буферы, гистидин-сульфатные буферы и тому подобные, например, гистидин-ацетатные буферы или гистидин-гидрохлоридные буферы. Гистидин-ацетатные буферы получают из гистидина и уксусной кислоты, и буферы на основе соли гистидина получают из гистидина и соляной кислоты.

«Цитратный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы цитрата. 30 Примеры цитратных буферов включают лимонную кислоту-цитрат натрия, лимонную кислоту-цитрат калия, лимонную кислоту-цитрат кальция, лимонную кислоту-цитрат магния и тому подобные. Цитратный буфер может представлять собой лимонную кислоту-цитрат натрия.

«Сукцинатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы сукцината. 35 Примеры сукцинатных буферов включают янтарную кислоту-сукцинат натрия, янтарную кислоту-сукцинат калия, янтарную кислоту-сукцинат кальция и

тому подобные. Данный сукцинатный буфер может представлять собой янтарную кислоту-сукцинат натрия.

«Фосфатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ионы фосфата. Примеры фосфатных буферов включают динатрия гидрофосфат-натрия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат-калия дигидрофосфат, динатрия гидрофосфат-лимонную кислоту и тому подобные. Фосфатный буфер может представлять собой динатрия гидрофосфат-натрия дигидрофосфат.

«Ацетатный буфер» представляет собой буфер содержащий ацетатные ионы. Примеры ацетатных буферов включают уксусную кислоту-ацетат натрия, уксусную кислоту-соль гистидина, уксусную кислоту-ацетат калия, уксусную кислоту-ацетат кальция, уксусную кислоту-ацетат магния и тому подобные. Ацетатный буфер может представлять собой уксусную кислоту-ацетат натрия.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или более чем одно соединение или его физиологически/фармацевтически приемлемые соли, или пролекарства, описанные в данном документе, и другие химические компоненты, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Подразумевается то, что фармацевтическая композиция стимулирует введение в организм таким образом, чтобы облегчать поглощение активного ингредиента, оказывая, посредством этого, биологическую активность. Термины «фармацевтическая композиция» и «препарат» в том виде, как они используются в данном документе, могут использоваться взаимозаменяемо.

Если не определено иначе, растворитель в фармацевтической композиции, описанной в настоящем раскрытии в виде раствора, представляет собой воду.

Термин «лиофилизированный препарат» относится к препарату или фармацевтической композиции, полученной лиофилизацией фармацевтической композиции или препарата в виде жидкости или раствора в вакууме.

Термин «примерно» или «приблизительно» в том виде, как он используется в данном документе, означает то, что числовое значение находится в пределах приемлемого интервала ошибки для конкретного значения, определенного обычным специалистом в данной области, и данное числовое значение отчасти зависит от того, как измеряют или определяют данное значение (т.е. от ограничений системы измерения). Например, «примерно» может означать стандартное отклонение в пределах 1 или более, чем 1 в каждой методике в данной области. Или термин «примерно», или «по существу включает» может означать интервал вплоть до плюс/минус 20%, например, pH примерно 5,5

означает рН 5,5 плюс/минус 1,1. Кроме того, в частности для биологических систем или процессов данный термин может означать вплоть до порядка значения или вплоть до 5 раз от числового значения. Если не утверждается иное, когда в настоящей заявке и формуле изобретения приводится конкретное значение, следует предполагать то, что значение «примерно» или «по существу включает» находятся в пределах приемлемого интервала ошибки для данного конкретного значения.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем раскрытии, может достигать эффекта стабильности: антитело в данной фармацевтической композиции по существу сохраняет его физическую и/или химическую стабильность, и/или биологическую активность после хранения; например, данная фармацевтическая композиция по существу сохраняет его физическую и химическую стабильность, а также его биологическую активность после хранения. Период хранения обычно выбирают на основе предварительно определенного срока хранения данной фармацевтической композиции. В настоящее время доступно множество аналитических методик для измерения стабильности белка, и можно измерять стабильность после хранения в течение выбранного периода времени при выбранной температуре.

Стабильным фармацевтическим препаратом антител является препарат, в котором не наблюдается значимое изменение при следующих условиях: хранение при температуре охлаждения (2-8°C) в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 1 года или самое большее 2 лет. Кроме того, стабильные жидкие препараты включают жидкие препараты, которые демонстрируют желательные характеристики после хранения при 25°C в течение периодов, включающих 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев или хранения при 40°C в течение периодов, включающих 1 месяц. Типичные приемлемые критерии для стабильности являются следующими: типично деградирует не больше, чем примерно 10%, например, не больше, чем примерно 5% мономера антитела при измерении ГФ-ВЭЖХ (гель-фильтрация-высокоэффективная жидкостная хроматография). Данный фармацевтический препарат антитела является бесцветным или от прозрачного до слегка опалесцентного при визуальном анализе. Концентрация, рН и осмоляльность данного препарата имеют изменения не больше, чем плюс/минус 10%. Типично наблюдаются фрагментации не больше, чем примерно 10%, например, не больше, чем примерно 5%. Типично

формируются агрегации не больше, чем примерно 10%, например, не больше, чем примерно 5%.

Антитело «сохраняет его физическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если оно не демонстрирует значимого увеличения агрегации, осаднения и/или денатурации при визуальной проверке цвета и/или прозрачности, или при определении посредством рассеяния света в УФ (ультрафиолетовый диапазон спектра), гель-фильтрации (ГФ) и динамического рассеяния света (ДРС). Изменения конформации белка можно оценивать посредством флуоресцентной спектроскопии (которая определяет третичную структуру белка) и посредством спектроскопии FTIR (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) (которая определяет вторичную структуру белка).

Антитело «сохраняет его химическую стабильность» в фармацевтическом препарате, если оно не демонстрирует значимого химического изменения. Химическую стабильность можно оценивать посредством выявления и количественного измерения измененных форм данного белка. Процессы деградации, которые часто изменяют химическую структуру белков, включают гидролиз или фрагментацию (оцениваемые такими способами, как гель-фильтрация и SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия)), окисление (оцениваемое такими способами, как пептидное картирование в комбинации с масс-спектрометрией или MALDI/TOF/MS (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), дезамидирование (оцениваемое такими способами, как ионообменная хроматография, капиллярная изоэлектрофокусировка, пептидное картирование и определение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризация (оцениваемая по определению содержания изоаспарагиновой кислоты, пептидному картированию и т.д.).

Антитело «сохраняет его биологическую активность» в фармацевтическом препарате, если биологическая активность данного антитела в данное время находится в пределах заданного интервала биологической активности, демонстрируемого во время получения данного фармацевтического препарата. Биологическую активность антитела можно определять, например, посредством анализа связывания антигена.

Используемые в данном документе трехбуквенные и однобуквенные коды аминокислот являются такими, как описано в *J. biol. chem*, 243, p3558 (1968).

«Антитело», описанное в настоящем раскрытии, относится к иммуноглобулину, и природное интактное антитело представляет собой структуру

из четырех пептидных цепей, образованную соединением между двумя идентичными тяжелыми цепями и двумя идентичными легкими цепями посредством межцепочечных дисульфидных связей. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулина отличаются по их аминокислотному составу и организации и, таким образом, по их антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно 5 делить на пять классов, иначе именуемых изотипами иммуноглобулинов, а именно: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE с их соответствующими тяжелыми цепями, представляющими собой цепь μ , цепь δ , цепь γ , цепь α и цепь ϵ соответственно. Ig того же самого класса может быть разделен на разные подклассы согласно 10 различиям аминокислотного состава шарнирных областей и числа и положений дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть подразделен на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи подразделяют на цепи κ или λ согласно различиям в константных областях. Каждый из данных пяти классов Ig может иметь цепь κ или цепь λ .

15 В тяжелых и легких цепях антитела последовательности из примерно 110 аминокислот около N-конца значительно варьируют и, таким образом, именуются 20 вариабельными областями (области Fv); остальные аминокислотные последовательности около C-конца являются относительно стабильными и, таким образом, называются константными областями. Вариабельные области содержат 3 гипервариабельные области (HVR) и 4 каркасные области (FR) с относительно консервативными последовательностями. Данные 3 гипервариабельные области определяют специфичность антитела и, таким образом, также известны как 25 области, определяющие комплементарность (CDR). Каждая вариабельная область легкой цепи (LCVR) или вариабельная область тяжелой цепи (HCVR) состоит из 3 CDR и 4 FR, организованных от аминоконца до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. 3 CDR легкой цепи относятся к LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и 3 CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Аминокислотные остатки CDR LCVR и HCVR антител или 30 антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем раскрытии, соответствуют известной схеме нумерации Kabat (LCDR1-3, HCDR2-3) или соответствуют схемам нумерации Kabat и Chothia (HCDR1) в количественных и позиционных показателях.

35 Антитело по настоящему раскрытию включает мышинные антитела, химерные антитела и гуманизированные антитела, например, гуманизированные антитела.

Термин «мышинное антитело» в том виде, как он используется в настоящем раскрытии, относится к моноклональному антителу против человеческого ANGPTL3, полученному согласно знаниям и квалификации в данной области. Во время получения антиген ANGPTL3 инъецируют анализируемому субъекту, и затем
5 выделяют гибридомы, экспрессирующие антитела с желательными последовательностями или функциональными свойствами. В одном альтернативном воплощении настоящего раскрытия мышинное антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент может дополнительно содержать константную область легкой цепи мышинной цепи κ или λ , или ее варианта, или
10 дополнительно содержит константную область тяжелой цепи мышинного IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или ее вариант.

Термин «химерное антитело», описанный в данном документе, относится к антителу, полученному слиянием переменной области гетерологичного (например, мышинного) антитела и константной области антитела (например,
15 человеческого антитела), что может ослаблять иммунный ответ, индуцированный данным гетерологичным антителом. Например, человечески-мышинное химерное антитело создают посредством первоначального создания гибридомы, секретирующей мышинное специфичное моноклональное антитело, затем клонированием гена переменной области из мышинных гибридомных клеток,
20 клонированием гена константной области человеческого антитела по мере необходимости, соединением мышинного гена переменной области и человеческого гена константной области в химерном гене, вставкой химерного гена в экспрессионный вектор и, наконец, осуществлением экспрессии молекул химерного антитела в эукариотической системе или прокариотической системе. В
25 одном альтернативном воплощении настоящего раскрытия легкая цепь антитела химерного антитела против ANGPTL3 дополнительно содержит константную область легкой цепи человеческих цепей κ и λ или их вариантов. Тяжелая цепь антитела химерного антитела против ANGPTL3 дополнительно содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или
30 его варианта, например, константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, IgG2 или IgG4, или варианта IgG1, IgG2 или IgG4, полученного с использованием мутации аминокислоты (например, мутация L234A и/или L235A, и/или мутация S228P).

Термин «гуманизированное антитело», также известное как антитело с
35 привитым CDR, относится к антителу, продуцируемому прививкой гетерологичных (например, мышинных) последовательностей CDR в каркас переменной области

человеческого антитела, т.е. другой тип последовательности каркаса антитела человеческой зародышевой линии. Такое антитело может преодолевать гетерогенную реакцию, индуцированную химерным антителом, из-за того, что оно несет большое количество компонентов мышинового белка. Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности гена антитела зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии генов переменных областей человеческих тяжелой и легкой цепи могут быть найдены в базе данных последовательностей человеческой зародышевой линии «VBase» (доступной по адресу в Интернете: www.mrcsre.com.ac.uk/vbase), а также в Kabat, E. A. et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition. Для того, чтобы избежать уменьшения активности, вызванного снижением иммуногенности, последовательность FR в переменной области человеческого антитела можно подвергать минимальной реверсивной мутации или обратной мутации для поддержания активности. Гуманизированное антитело по настоящему раскрытию также включает гуманизированные антитела, которые дополнительно подвергали мутации созревания аффинности CDR посредством дрожжевого дисплея.

Термины «человеческое антитело» и «антитело человеческого происхождения» используются взаимозаменяемо и означают то, что одна или более чем одна из переменных и константных областей происходит от последовательностей человеческого иммуноглобулина. Одним альтернативным способом является то, что все из переменных и константных областей происходят от последовательностей человеческого иммуноглобулина, т.е. «антитела полностью человеческого происхождения» или «полностью человеческие антитела». Данные антитела можно получать целым рядом способов, включая антитела, полученные выделением В-клеток из человеческих РВМС (одноядерные клетки периферической крови), селезенки и ткани лимфатических узлов, и конструирование библиотеки природных одноцепочечных фаговых человеческих антител с использованием технологии фагового дисплея или осуществления иммунизации трансгенных мышей, способных экспрессировать легкие и тяжелые цепи человеческого антитела, и скрининга. Человеческие антитела по настоящему раскрытию также включают антитела, которые все еще связываются с интересующим антигеном и получают посредством мутации одной или более чем одной аминокислоты на основе человеческих антител.

Помимо полноразмерных антител, «антитела», описанные в данном документе, также включают антигенсвязывающие фрагменты, способные к связыванию с антигеном.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» или «функциональный фрагмент» 5 относится к одному или более чем одному фрагменту антитела, который сохраняет способность к специфичному связыванию с антигеном (например, ANGPTL3). Показано, что фрагмент полноразмерного антитела можно использовать для осуществления функции связывания антигена антитела. Примеры связывающего 10 фрагмента, включенного в термин «антигенсвязывающий фрагмент», включают следующие: (i) фрагмент Fab – одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂ - двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из 15 доменов VH и VL одной ручки антитела; (v) dsFv – стабильный антигенсвязывающий фрагмент, образованный VH и VL посредством межцепочечных дисульфидных связей между ними; (vi) диатело – биспецифичное антитело и мультиспецифичное антитело, содержащее такие фрагменты, как scFv, dsFv и Fab. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv – VL и VH – и кодируются 20 отдельными генами, они могут быть связаны синтетическим линкером способом генной инженерии, производя, таким образом, одну белковую цепь, в которой области VL и VH формируют пару с образованием одновалентной молекулы (именуемой одноцепочечный Fv (scFv); см, например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426 и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включаются в термин «антигенсвязывающий 25 фрагмент» антитела. Такие фрагменты антитела получают традиционными методиками, известными специалистам в данной области, и подвергают скринингу на пригодность таким же способом, как для интактных антител. Антигенсвязывающие группировки можно получать методикой генной инженерии или ферментативным катализом, или химическим расщеплением интактных 30 иммуноглобулинов. Антитела могут быть разных изотипов, например, антитело IgG (например, подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

«Мутации» в мутировавших последовательностях, описанных в настоящем раскрытии, включают «обратную мутацию», «консервативную модификацию» или «консервативную замену». «Консервативная модификация» или «консервативная 35 замена», описанная в настоящем раскрытии, относится к замене аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими аналогичные характеристики

(например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность или конформация и жесткость остова), таким образом, что можно часто делать замены без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области известно то, что, вообще говоря, замена одной аминокислоты в несущественной области полипептида существенно не изменяет биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., страница 224, (4-е издание)). Кроме того, замена аминокислотами с аналогичной структурой или функцией с малой вероятностью нарушит биологическую активность.

10 «Мутировавшая последовательность», описанная в настоящем раскрытии, относится к нуклеотидной последовательности и/или аминокислотной последовательности, имеющей другую степень процента идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью и/или аминокислотной последовательностью настоящего раскрытия, когда в отношении нуклеотидной последовательности и/или аминокислотной последовательности по настоящему раскрытию подходящим образом делают мутационные модификации, такие как замены, вставки или делеции. Идентичность последовательности, описанная в настоящем раскрытии, может составлять по меньшей мере 85%, 90% или 95%, например, по меньшей мере 95%. Неограничивающие примеры включают 85%, 15 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием установок по умолчанию алгоритма BLASTN/BLASTP, доступного на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации.

25 Термины «идентичность последовательности» или «гомология последовательности» при применении к аминокислотным последовательностям относятся к сходству последовательностей между двумя белками или полипептидами. При занятии положения в обеих из двух последовательностей, подлежащих сравнению, одинаковым аминокислотным остатком, например, если 30 положение в обоих полипептидах занято одинаковым аминокислотным остатком, данные молекулы являются идентичными в этом положении. Примерами подходящих алгоритмов для определения процента идентичности последовательности и процента сходства последовательности являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описываются в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 35 соответственно. Программа для осуществления анализов BLAST является

общедоступной в Национальном центре биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Способы продуцирования и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов являются хорошо известными в предшествующем уровне техники, например, способы, описанные в главах 5-8 и 15 "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press. Описанные в данном документе антитело или антигенсвязывающий фрагмент являются генетически модифицированными для содержания одной или более чем одной человеческой FR в CDR, не являющейся человеческой. Последовательности зародышевой линии человеческой FR можно получить на веб-сайте <http://imgt.cines.fr> ImMunoGeneTics (IMGT) или в immunoglobulin journal, 2001 ISBN 012441351 посредством сравнения в базе данных IMGT генов зародышевой линии переменных областей человеческих антител с использованием программы MOE.

Генетически модифицированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему раскрытию можно получать и очищать традиционными способами. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно клонировать и рекомбинировать в экспрессионный вектор GS. Экспрессионные векторы рекомбинантных иммуноглобулинов можно стабильно трансфицировать в клетки CHO (яичники китайского хомяка). В качестве более рекомендованного предшествующего уровня техники экспрессионные системы млекопитающих будут приводить к гликозилированию антител, в частности на высококонсервативном N-концевом сайте области Fc. Стабильные клоны получают посредством экспрессии антитела, которое специфично связывается с человеческим CD40. Позитивные клоны размножают в бессывороточной среде биореактора с продукцией антител. Культуральную среду с секретированным антителом можно очищать традиционными методиками. Например, очистку проводят с использованием колонки FF с A или G сефарозой, содержащей подведенный буфер. Неспецифично связанные фракции смывают. Связанное антитело элюируют посредством способа градиента pH, и фрагменты антитела выявляют посредством SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и отбирают. Антитело можно фильтровать и концентрировать традиционными способами. Растворимые смеси и полимеры также можно удалять традиционными способами, такими как молекулярные сита и обмен ионов. Образующийся продукт необходимо немедленно замораживать, например, при -70°C , или лиофилизировать.

«Введение» и «обработка», при применении к животным, человеку, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относится к контакту экзогенного лекарственного средства, терапевтического средства, диагностического средства или композиции с животными, человеком, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. «Введение» и «обработка», например, могут относиться к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клеток включает приведение в контакт реактива с клетками и приведение в контакт реактива с жидкостью, где данная жидкость находится в контакте с клетками. «Введение» и «обработка» также относятся к обработке, например, клеток реактивами, диагностическими, связывающими композициями или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Осуществление обработки», при применении к человеку, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтической обработке, предупредительным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим приложениям.

«Лечение» относится к введению терапевтического средства, например, композиции, содержащей любую из связывающих композиций по настоящему раскрытию, либо внутренне, либо внешне субъекту, имеющему один или более чем один симптом заболевания, для которого известно, что данное терапевтическое средство имеет терапевтический эффект. Типично терапевтическое средство вводят в эффективном количестве для облегчения одного или более чем одного симптома заболевания у подвергающегося лечению субъекта или популяции для индукции регрессии таких симптомов или для ингибирования развития таких симптомов в любой клинически измеримой степени. Эффективное количество терапевтического средства для облегчения любого конкретного симптома заболевания (также именуемое «терапевтически эффективное количество») может варьировать, в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст и масса субъекта, и способность данного лекарственного средства давать желательный терапевтический эффект у данного субъекта. То, был ли облегчен симптом заболевания, можно оценивать любыми способами клинического анализа, обычно используемыми врачами или другими профессионалами системы здравоохранения, для оценки тяжести или прогрессирования симптома. Хотя воплощения настоящего раскрытия (например, способы лечения или изделия) и могут быть неэффективными в облегчении симптомов каждого интересующего заболевания, они должны облегчать симптомы интересующего заболевания у

статистически значимого числа субъектов при определении посредством любого статистического критерия, известного в данной области, такого как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

5 «Эффективное количество» включает достаточное количество для облегчения или предупреждения симптома или расстройства медицинского заболевания. Эффективное количество также относится к достаточному количеству для обеспечения или облегчения диагностики. Эффективное количество для конкретного субъекта или ветеринарного субъекта может
10 варьировать, в зависимости от таких факторов, как расстройство, подлежащее лечению, общее состояние здоровья данного субъекта, способ, путь и дозировка введения, и тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозировку или схему введения для того, чтобы избежать значимых побочных эффектов или токсических эффектов.

15 «Значение T_m » относится к температуре тепловой денатурации белка, т.е. к температуре, при которой половина белков разворачивается, и пространственная структура белка нарушается. Следовательно, чем выше значение T_m , тем выше термостабильность белка.

20

ПРИМЕРЫ

Настоящее раскрытие дополнительно описывается ниже со ссылкой на
примеры, которые, однако, не предназначены для того, чтобы ограничивать
настоящее раскрытие. Экспериментальные способы в примерах по настоящему
25 раскрытию, в которых конкретные условия точно не определяются, обычно проводятся при традиционных условиях, таких как описанные в *Antibodies: A Laboratory Manual and Molecular Cloning: A Laboratory Manual* by Cold Spring Harbor Laboratory, или при условиях, рекомендованных изготовителем сырья или товаров. Реактивы без конкретного указанного происхождения представляют собой
30 имеющиеся в продаже традиционные реактивы.

Пример 1: конструирование и экспрессия антигенов ANGPTL3

В качестве матриц ANGPTL3 в настоящем раскрытии использовали
человеческий белок ANGPTL3 (№ Uniprot Q9Y5C1), мышинный белок ANGPTL3 (№
35 Uniprot Q9R182), белок ANGPTL3 яванского макака (№ Uniprot A0A2K5UDC5) и крысиный белок ANGPTL3 (№ Uniprot F7FHP0) для конструирования антигенов и

белков для выявления, включенного в настоящее раскрытие. Белки ANGPTL3 сливали с разными метками и клонировали в векторы рТТ5 (Biovector, кат. №: 102762), и клетки 293 временно трансфицировали полученными в результате векторами, и они подвергались экспрессии. Экспрессионные продукты затем
 5 очищали с получением кодируемых антигенов и белков для выявления по настоящему раскрытию.

1. Полноразмерный человеческий ANGPTL3: человеческий ANGPTL3(17-460)-His, используемый для иммунизации и выявления и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

10 MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH
GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEKELRRTTYKLQVKNEEVK
 NM SLELNSKLESLL EEKILLQQKV KYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTS LKTFVEKQDN
 SIKDLLQTVEDQYKQLNQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNE
 15 IRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQ
 NFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH YIEYSFYL
 GNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKA KGHFNCP EGYSGGWWWHDE
 CGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESEFHHHH
 HHHHHH

SEQ ID NO: 1

20 Примечание: часть с одиночным подчеркиванием представляет последовательность сигнального пептида, часть, выделенная курсивом, представляет последовательность His, и часть, выделенная жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положения 17 до 460 полноразмерного человеческого белка ANGPTL3.

25 2. Внеклеточная область человеческого ANGPTL3: человеческий ANGPTL3(17-170)-Flag-His, используемый для иммунизации и выявления и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

30 MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSLSPPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH
GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEKELRRTTYKLQVKNEEVK
 NM SLELNSKLESLL EEKILLQQKV KYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTS LKTFVEKGSS
 DYKDDDDKHHHHHHH

SEQ ID NO: 2

35 Примечание: часть с одиночным подчеркиванием представляет сигнальный пептид, часть с двойным подчеркиванием представляет линкерный пептид, часть, выделенная курсивом, представляет Flag и His, и часть, выделенная жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положения 17 до 170 полноразмерного человеческого белка ANGPTL3.

40 3. Слитый белок внеклеточной области человеческого ANGPTL3 (человеческий ANGPTL3(17-170)) и сегмента мышинового IgG2aFc (сокращенного как mFc): человеческий ANGPTL3(17-170)-mFc, использованный для выявления и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRIDQDNSSFDSL**SPEPKSRFAM**LDDVKILANGLLQLGH**
GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEEKELRRTTYKLQVKNEEVK
NMSLELNSKLESLLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTS**LKTFVEKEPR**
GPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWF
 5 **VNNVEVHTAQQT**THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWM**SGKEFKCKVNNKDL**PAPIERTIS
KPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE
PVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 3

Примечание: подчеркнутая часть представляет сигнальный пептид, часть,
 10 выделенная курсивом, представляет мышиный IgG2aFc, и часть, выделенная
 жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положения 17 до 170
 полноразмерного человеческого белка ANGPTL3.

4. Слитый белок внеклеточной области человеческого ANGPTL3
 (человеческий ANGPTL3(17-220)) и сегмента мышинового IgG2aFc: человеческий
 15 ANGPTL3(17-220)-mFc, использованный для иммунизации и выявления и имеющий
 следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRIDQDNSSFDSL**SPEPKSRFAM**LDDVKILANGLLQLGH**
GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKEEEEKELRRTTYKLQVKNEEVK
 20 **NMSLELNSKLES**LLEEKILLQQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTS**LKTFVEKQDN**
SIKDLLQTVEDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPEPRGPTIKPCPPC
KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW**FVNNVEVHTA**
QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL**PAPIERTISKPKGSVRAP
QVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS**DGSY**
 25 **FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK****

SEQ ID NO: 4

Примечание: подчеркнутая часть представляет сигнальный пептид, часть,
 выделенная курсивом, представляет мышиный IgG2aFc, и часть, выделенная
 жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положений 17 до 220
 полноразмерного человеческого белка ANGPTL3.

30 5. Полноразмерный мышиный ANGPTL3: мышиный ANGPTL3(17-455)-His,
 используемый для иммунизации и выявления и имеющий следующую
 аминокислотную последовательность:

MEFGLSWLFLVAILKGVQC**SRVDPDLSSFDS**APSEPKSRFAM**LDDVKILANGLLQLGH**
GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKEEEEKELRRTTSTLQVKNEEVK
 35 **NMSVELNSKLES**LLEEKALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAQEHPEVTS**LKSFVEQQD**
NSIRELLQSVEEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPS**ENSLSSKSRAPRTTPPLQL**
NETENTEQDDLPADCSAVYNRGEHTSGVYTIKPRNSQGFNVYCDTQSGSPWT**LIQHR**
KDGSQDFNETWENYEKGFGRLDGEFWLGLEKIYAIVQQSNYILRLELQDWKDSKH**YV**
EYSFHLGSHETNYTLHVAEIAGNIPGALPEHTDLMFSWNHRAKGGQLYCPE**SYSGGW**
 40 **WWNDICGENNLNGKYNKPRTKSRPERRRGIYWRPQSRKLYAIKSSKMLQPTT**HHH
HHHHHHH

SEQ ID NO: 5

Примечание: подчеркнутая часть представляет сигнальный пептид, часть,
 выделенная курсивом, представляет последовательность His, и часть, выделенная

жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положений 17 до 455 полноразмерного мышинового белка ANGPTL3.

6. Слитый белок внеклеточной области мышинового ANGPTL3 (мышинный ANGPTL3(17-220)) и сегмента мышинового IgG2aFc: мышинный ANGPTL3(17-220)-mFc, используемый для иммунизации и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPLSSFDSAPSEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGH
GLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLRTNEIKKEEKELRRTTSTLQVKNEEVK
NMSVELNSKLESLLLEKTALQHKVRALEEQLTNLILSPAGAQEHPVTSLSKFVEQQD
NSIRELLQSVEEQYKQLSQQHMQIKEIEKQLRKTGIQEPSENSLSSKSEPRGPTIKPCP
PCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMI^SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN^NVEVH
TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVR
APQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD^FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG
SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO: 6

Примечание: подчеркнутая часть представляет сигнальный пептид, часть, выделенная курсивом, представляет мышинный IgG2aFc, и часть, выделенная жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положения 17 до 220 полноразмерного мышинового белка ANGPTL3.

7. Полноразмерный ANGPTL3 яванского макака: ANGPTL3(17-460)-His яванского макака, используемый для выявления и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRIDQDNSSFDSVSPEPKSRFAMLDDVKILANGLL
QLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSEIKKEEKELRRTTY
KLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLLEKILLQQKVYLEEQLTNLIQNQPATP
EHPEVTSLSKSFVEKQDNSIKDLLQTVEEQYKQLNQQHSQIKEIENQLRMTNI
QEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHDGIPADCTTIYNRGEHISGTYAI
RPSNSQVFHVYCDVVS^GSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEF
WLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKNKH^YIEYSFYLG^NHETNYTLHVVKI
TGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKA^KGHFSCPE^SSYSGG^WWHDEC^GENNL^NNG
KYNKPRTKSKPERRRGLSWK^SQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFEHHHHHHHH
HHH

SEQ ID NO: 7

Примечание: подчеркнутая часть представляет сигнальный пептид, часть, выделенная курсивом, представляет последовательность His, и часть, выделенная жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положения 17 до 460 полноразмерного белка ANGPTL3 яванского макака.

8. Полноразмерный крысиный ANGPTL3: крысиный ANGPTL3(17-455)-His, используемый для выявления и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRVDPDLSPFDSVPSEPKSRFAMLDDVKILANGLL
QLGHGLKDFVHKTKGQINDIFQKLNIFDQCFYDLSLQTNEIKEEEKELRRTT
SKLQVKNEEVKNMSLELNSKLESLLLEEKMALQHRVRALEEQLTSLVQNPPG
AREHPEVTSLKSFVEQQDNSIRELLQSVEEQYKQLSQQHIQIKEIENQLRKTG
 5 **IQEPTEENSLYSKPRAPRTTPPLHLKEAKNIEQDDLPA****DCSAIYNRGEHTSGVY**
TIRPSSSQVFNVCYCDTQSGTPRPTLIQHRKDG**SQNFNQTWENYEKGFGRLDGE**
FWLGLEKIYAIVKQSNYILRLELQDWKDSKH**YAEYSFHLGNHETNYTLHVA**
EIAANPEALPEHRDLMFSTWDHRAKGQLYC**PESYSGGWWFSDMCGENNLN**
GKYNKPRAKSKPERRRGISWRPRGGKLYSIKSSK**MMLQPTT****HHHHHHHHHHH**

10

SEQ ID NO: 8

Примечание: подчеркнутая часть представляет сигнальный пептид, часть, выделенная курсивом, представляет последовательность His, и часть, выделенная жирным шрифтом, представляет аминокислоты от положения 17 до 455 полноразмерного крысиного белка ANGPTL3.

15

Пример 2: очистка белков антигена ANGPTL3, гибридные антитела и рекомбинантные антитела

2.1. Очистка рекомбинантных белков с His метками или рекомбинантных белков с метками Flag-His

20

Образец экспрессирующих клеток центрифугировали на высокой скорости для удаления клеток и нерастворимых примесей, супернатант отбирали, и добавляли имидазол, пока конечная концентрация не составляла 5 мМ. Никелевую колонку уравнивали раствором PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), содержащим 5 мМ имидазол, и промывали 2-5 объемами колонки. Загружали в колонку супернатант клеток. Данную колонку промывали раствором PBS, содержащим 5 мМ имидазол, пока показатель A280 (поглощение при длине волны 280 нм) не падал до исходного уровня. Данную хроматографическую колонку затем промывали PBS плюс 10 мМ имидазолом для удаления неспецифично связанных белковых примесей, и отбирали элюат. Целевой белок элюировали раствором PBS, содержащим 300 мМ имидазол, и отбирали пик элюции.

25

30

Отобранный элюат дополнительно очищали с использованием гель-фильтрационной колонки Superdex и затем отбирали с использованием пробирок. После подтверждения полученного образца SDS-PAGE, пептидного картирования и ЖХ-МС его аликвотировали для применения позднее. Таким образом, получали рекомбинантные белки с His метками или рекомбинантные белки с метками Flag-His.

35

2.2. Очистка гибридомных антител или рекомбинантных белков с метками mFc

Образец центрифугировали на высокой скорости для удаления клеток и нерастворимых примесей, и отбирали супернатант. Аффинную колонку с белком А уравнивали 1× PBS и промывали 2-5 объемами колонки. Загружали на колонку образец супернатанта экспрессирующих клеток, полученный центрифугированием. Данную колонку промывали 1× PBS, пока показатель A280 не падал до исходного уровня. Данную колонку промывали 1× PBS. Целевой белок элюировали 0,1 М уксусной кислотой (pH 3,5-4,0), отбирали элюированный белок, затем немедленно делали нейтральным с использованием 1 М Tris-HCl (pH 7,0) и, наконец, осуществляли обмен с 1× буфером PBS посредством диализа или концентрирования. Образец отбирали, подтверждали электрофорезом, пептидным картированием и ЖХ-МС, и затем аликвотировали для применения позднее. Таким образом, получали рекомбинантные белки с метками mFc или гибридомные антитела.

2.3. Очистка антител и рекомбинантных белков с метками Fc

Образец центрифугировали на высокой скорости для удаления клеток и нерастворимых примесей, и отбирали супернатант. Аффинную колонку с белком G уравнивали 1× PBS и промывали 2-5 объемами колонки. Загружали на колонку образец супернатанта экспрессирующих клеток, полученный центрифугированием. Данную колонку промывали 1× PBS, пока показатель A280 не падал до исходного уровня. Данную колонку промывали 1× PBS. Целевой белок элюировали уксусной кислотой (pH 3,0), отбирали элюированный белок, затем немедленно делали нейтральным с использованием 1 М Tris-HCl (pH 7,0) и, наконец, осуществляли обмен с 1× буфером PBS посредством диализа или концентрирования. Образец отбирали, подтверждали электрофорезом, пептидным картированием и ЖХ-МС, и затем аликвотировали для применения позднее. Таким образом, получали антитела или рекомбинантные белки с метками hFc.

Пример 3: получение антител против ANGPTL3

3.1. Скрининг на антитела человеческого происхождения против ANGPTL3 посредством фаговой библиотеки

Осуществляли упаковку и концентрирование библиотеки одноцепочечных антител на основе человеческого фага, и затем данную фаговую библиотеку (10^{12} -

10¹³ /БОЕ (бляшкообразующие единицы)) суспендировали в 1 мл 2% MPBS (PBS, содержащий 2% обезжиренного сухого молока), и добавляли 100 мкл Dynabeads® M-280 со стрептавидином (Invitrogen, кат. № 11206D). Пробирку помещали на ротатор и многократно переворачивали, затем блокировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Данную пробирку оставляли на магнитном держателе на 2 мин, Dynabeads удаляли, и фаговую библиотеку переносили в новую пробирку. Добавляли к блокированной фаговой библиотеке 2 мкг/мл человеческого ANGPTL3(17-460)-His, меченного биотином, и пробирку помещали на ротатор и многократно переворачивали в течение 1 ч. Тем временем, отмеряли 100 мкл Dynabeads и суспендировали в 1 мл 2%-ного MPBS, и пробирку помещали на ротатор, многократно переворачивали и блокировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Данную пробирку оставляли на магнитном держателе на 2 мин, и блокирующий раствор отбирали пипеткой. Добавляли в смесь фаговой библиотеки и человеческого ANGPTL3(17-460)-His Dynabeads, и пробирку, содержащую образую смесь, помещали на ротатор и многократно переворачивали в течение 15 мин. Пробирку оставляли на магнитном держателе на 2 мин, и данную смесь отбирали пипеткой. Dynabeads 10 раз промывали 1 мл PBST (PBS, содержащий 0,1% Tween-20), и добавляли 0,5 мл 1 мг/мл трипсина (Sigma, кат. № T1426-250MG). Пробирку помещали на ротатор и инкубировали в течение 15 мин, многократно переворачивали, и проводили элюцию. Элюированный фаг использовали для инфицирования *E. coli* TG1, и данную *E. coli* TG1 высаживали на чашки. Одиночные клоны случайным образом отбирали для ELISA (твёрдофазный иммуноферментный анализ) фага.

Данные клоны высевали в 96-луночный глубоколоночный планшет (Nunc, кат. № 260251) и инкубировали при 37°C в течение 16-18 ч. Отбирали малое число инкубированных клонов и высевали в другой 96-луночный глубоколоночный планшет. При достижении ОП600 (оптическая плотность при длине волны 600 нм) примерно 0,5 добавляли для упаковки хелперные фаги M13K07 (NEB, кат. № N0315S). Данную смесь центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин для удаления бактерий, и культуральный раствор отбирали с использованием пипетки и подвергали анализу ELISA на связывание ANGPTL3. Штаммы позитивных клонов криоконсервировали и высылали в секвенирующую компанию для секвенирования. Аминокислотные последовательности, соответствующие позитивному клону P8, являются следующими:

> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи P8:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPRDDS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 9

5 > Последовательность вариабельной области легкой цепи P8:

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 10

10 Примечание: подчеркнутые части в последовательностях представляют последовательности CDR, определенные согласно системе нумерации Kabat, и части, выделенные курсивом, представляет последовательности FR.

3.2. Мутация антитела против ANGPTL3

15 На основе трехмерной структуры антитела P8 аминокислотный остаток в положении 55 (естественным образом последовательно пронумерованный) в вариабельной области тяжелой цепи P8 мутировали от D до E, а аминокислотный остаток в положении 34 (естественным образом последовательно пронумерованный) в вариабельной области легкой цепи P8 мутировали от G до V, получая, таким образом, новую молекулу антитела P8B, где аминокислотная
 20 последовательность P8B является следующей:

> Последовательность вариабельной области тяжелой цепи P8B:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPREDS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVW
GQGTTVTVSS

25 SEQ ID NO: 17

> Последовательность вариабельной области легкой цепи P8B:

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 18

30 Примечание: подчеркнутые части в последовательностях представляют последовательности CDR, определенные согласно системе нумерации Kabat, и части, выделенные курсивом, представляет последовательности FR.

Таблица 1. Последовательности CDR молекулы антитела P8B

CDR легкой цепи		CDR тяжелой цепи	
LCDR1	RSSQSLHSNVYTYLD (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. Конструирование и экспрессия антитела против ANGPTL3

Конструировали праймер, и фрагмент гена VH/VK антитела конструировали посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция) и гомологично рекомбинировали с экспрессионным вектором рНг (с сигнальным пептидом и фрагментом гена константной области (CH1-FC/CL)). Таким образом, конструировали экспрессионный вектор полноразмерного антитела VH-CH1-FC-рНг/VK-CL-рНг. Константную область тяжелой цепи данного антитела можно выбрать из группы, состоящей из константных областей человеческих IgG1, IgG2, IgG4 и их вариантов, и константную область легкой цепи данного антитела можно выбрать из группы, состоящей из константных областей легкой цепи человеческих цепей κ и λ , и их вариантов. В качестве иллюстрации, константная область тяжелой цепи антитела выбрана из варианта человеческого IgG4-YTE, последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 19, и константная область легкой цепи выбрана из константной области человеческой цепи κ , последовательность которой изложена в SEQ ID NO: 20.

> Последовательность константной области тяжелой цепи варианта человеческого IgG4-YTE:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO: 19

> Последовательность константной области легкой цепи человеческой цепи κ :

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

В качестве иллюстрации, константные области легкой/тяжелой цепи, описанные выше, объединяли с вышеупомянутыми переменными областями P9B с образованием полного антитела против ANGPTL3: P8BG. Последовательности легкой/тяжелой цепи данного антитела являются следующими:

> Последовательность тяжелой цепи P8BG:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYDINWVRQAPGQGLEWVGLINPREDS
TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTMYMELSSLRSEDTAVYFCARDLGSIREVLYYGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC
 PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
 5 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
 GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 21

> Последовательность легкой цепи P8BG:

10 DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHNSVYTYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGQGTRLEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 TYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 22

Пример 4: оценка *in vitro* антител против ANGPTL3

15 4.1: анализ ELISA на связывание антител против ANGPTL3 с белками ANGPTL3

Антитело против ANGPTL3 ингибирует или препятствует по меньшей мере одной активности белка ANGPTL3 посредством связывания с белком ANGPTL3. Активность связывания антитела против ANGPTL3 с антигеном ANGPTL3 измеряли
 20 посредством анализа ELISA. Белок ANGPTL3 (человеческий ANGPTL3(17-170)-mFc) фиксировали на 96-луночном микропланшете посредством связывания с антителом козы против мышинового IgG, которым был покрыт микропланшет, и активность связывания антитела с ANGPTL3 определяли согласно интенсивности сигнала после добавления антитела. Тем временем, белки ANGPTL3 с HIS
 25 метками (мышиный ANGPTL3(17-455)-His, ANGPTL3(17-460)-His яванского макака и крысиный ANGPTL3(17-455)-His), меченный с использованием набора для мечения биотином (Dojindo China, LK03), фиксировали на 96-луночном микропланшете посредством связывания со стрептавидином, которым был покрыт микропланшет, и активность связывания антитела с ANGPTL3 определяли
 30 согласно интенсивности сигнала после добавления антитела.

Антитело козы против мышинового IgG (Sigma, M3534-1ML) разводили до концентрации 2 мкг/мл буфером PBS, pH 7,4 (Shanghai BasalMedia, B320) и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, CLS3590-100EA) в объеме 50
 35 мкл/лунку. Данный планшет оставляли в инкубаторе с температурой 37°C на 3 ч или оставляли при 4°C в течение ночи (16-18 ч). После отбрасывания жидкости добавляли блокирующий раствор разведенного PBS 5%-ного обезжиренного молока (BD, 232100) в объеме 250 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 3 ч или оставляли при 4°C в течение

ночи (16-18 ч) для блокирования. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и после промывки планшета 3 раза буфером PBST (PBS, pH 7,4, содержащий 0,05% Tween-20) добавляли человеческий ANGPTL3(17-170)-mFc (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 3), разведенный до 0,5 мкг/мл разбавителем образца (PBS, pH 7,4, содержащий 1% BSA) в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 2 ч. После завершения инкубации реакционный раствор в микропланшете отбрасывали. После промывки планшета 3 раза PBST добавляли анализируемое антитело, которое было разведено разбавителем образца до нескольких концентраций, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 2 ч. После завершения инкубации планшет 3 раза промывали PBST, и добавляли вторичное антитело козы против человеческого антитела (Jackson Immuno Research, 109-035-003), разведенное разбавителем образца, в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После промывки планшета 3 раза PBST добавляли хромогенный субстрат TMB (KPL, 52-00-03) в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2-5 мин, и добавляли MH_2SO_4 в объеме 50 мкл/лунку для остановки реакции. Поглощение при 450 нм записывали с использованием микропланшет-ридера VersaMax, и рассчитывали значение EC_{50} для связывания антитела против ANGPTL3 с белком-антигеном ANGPTL3. Результаты эксперимента показаны в Таблице 3.

Стрептавидин (Sigma, S4762-5MG) разводили до концентрации 3 мкг/мл буфером PBS, pH 7,4 (Shanghai BasalMedia, B320) и добавляли в 96-луночный микропланшет (Corning, CLS3590-100EA) в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет оставляли в инкубаторе с температурой 37°C на 3 ч или оставляли при 4°C в течение ночи (16-18 ч). После отбрасывания жидкости добавляли блокирующий раствор разведенного PBS 5%-ного обезжиренного молока (BD, 232100) в объеме 250 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 3 ч или оставляли при 4°C в течение ночи (16-18 ч) для блокирования. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали, и после промывки планшета 3 раза буфером PBST (PBS, pH 7,4, содержащий 0,05% Tween-20) добавляли меченый биотином мышиний ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 5), ANGPTL3(17-460)-His яванского макака (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 7) и крысиный ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID

NO: 8), которые были разведены до 0,5 мкг/мл разбавителем образца (PBS, pH 7,4, содержащий 1% BSA), в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 2 ч. После завершения инкубации реакционный раствор в микропланшете отбрасывали. После промывки планшета 3
 5 раза PBST добавляли анализируемое антитело, которое было разведено разбавителем образца до разных концентраций, в объеме 50 мкл/лунку, и данный планшет инкубировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 2 ч. После завершения инкубации планшет 3 раза промывали PBST, и добавляли вторичное антитело козы против мышинового антитела, меченное HRP (пероксидаза хрена)
 10 (Jackson Immuno Research, 115-035-003), или вторичное антитело козы против человеческого антитела (Jackson Immuno Research, 109-035-003), или вторичное мышиноое против M13, конъюгированное с HRP (Sino Biological, кат. № 11973-MM05-100, используемое для скрининга фагов), которые были разведены разбавителем образца, в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при 37°C в
 15 течение 1 ч. После промывки планшета 3 раза PBST добавляли хромогенный субстрат TMB (KPL, 52-00-03) в объеме 50 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2-5 мин, и добавляли MH_2SO_4 в объеме 50 мкл/лунку для остановки реакции. Поглощение при 450 нм записывали с использованием микропланшет-ридера VersaMax, и рассчитывали значение EC_{50}
 20 для связывания антитела против ANGPTL3 с белком-антигеном ANGPTL3. Результаты эксперимента показаны в Таблице 2. Данные результаты показывают то, что антитела против ANGPTL3 по настоящему раскрытию способны к связыванию с белками ANGPTL3 разных видов.

Таблица 2. Анализ ELISA на связывание антител против ANGPTL3 с
 25 белками ANGPTL3 разных видов

Антитело	EC_{50} связывания с человеческим ANGPTL3 (нМ)	EC_{50} связывания с мышинным ANGPTL3 (нМ)	EC_{50} связывания с ANGPTL3 яванского макака (нМ)	EC_{50} связывания с крысиным ANGPTL3 (нМ)
P8G	0,361	1,732	2,528	2,115
P8BG	0,172	0,105	0,200	0,528

4.2. Анализ HTRF (гомогенная флуоресценция с временным разрешением) на связывание антител против ANGPTL3 с белками-антигенами ANGPTL3

30 Также использовали анализ HTRF для измерения активности связывания антител против ANGPTL3 с антигенами. Антигены ANGPTL3 с HIS метками

(человеческий ANGPTL3(17-460)-His, мышинный ANGPTL3(17-455)-His, ANGPTL3(17-460)-His яванского макака и крысиный ANGPTL3(17-455)-His), меченные набором для мечения биотином (Dojindo China, LK03), связывали с реактивом HTRF стрептавидин-Tb cryptata (Cisbio, 610SATLA), и после добавления антитела, с антителом, связанным с реактивом HTRF Pab (поликлональное антитело) против мышинового IgG-XL665 (Cisbio, 61PAMXLA) и ангиопозтинподобным белком 3. Интенсивность сигнала использовали для определения активности связывания антитела с ангиопозтинподобным белком 3.

4 мкг/мл меченого биотином человеческого ANGPTL3(17-460)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 1), мышинового ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 5), ANGPTL3(17-460)-His яванского макака (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 7) и крысиного ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 8) получали с использованием разбавителя (PBS, pH 7,4, содержащий 1% BSA) и добавляли в 384-луночный планшет (PerkinElmer, optiplatte-384) в объеме 5 мкл/лунку, затем добавляли смесь реактива HTRF стрептавидин-Tb cryptata и Pab против мышинового IgG-XL665 в объеме 5 мкл/лунку и, наконец, добавляли анализируемое антитело, которое было разведено разбавителем образца до разных концентраций, в объеме 10 мкл/лунку. Данный планшет инкубировали при 25°C в течение 1 ч. Значения записывали с использованием PHERAstar FS (BMG LabTECH) на модуле HTRF, и рассчитывали значение EC₅₀ для связывания антитела против ANGPTL3 с ангиопозтинподобным белком 3. Результаты эксперимента показаны в Таблице 3. Данные результаты показывают то, что все антитела по настоящему раскрытию имеют хорошую активность связывания с антигенами ANGPTL3 человека, мыши, яванского макака, крысы и других видов.

Таблица 3. Анализ HTRF на связывание антител против ANGPTL3 с белками ANGPTL3

Антитело	EC ₅₀ (нМ) для связывания с белками ANGPTL3			
	Человеческий ANGPTL3	Мышиный ANGPTL3	ANGPTL3 яванского макака	Крысиный ANGPTL3
P8G	0,784	0,450	0,303	0,484
P8BG	0,277	0,321	0,360	0,362

4.3. Анализ ферментативной активности в отношении ингибирования LPL антителами против ANGPTL3

Эксперимент по выявлению ферментативной активности LPL использовали для измерения активности антитела против ANGPTL3 в блокировании ингибирования фермента LPL белками ANGPTL3.

Бычий LPL (Sigma, L2254-5KU) разводили буфером для разведения (PBS, pH 7,4 плюс 2 мг/мл BSA) до 12,5 единиц и добавляли в 96-луночный планшет (Corning, 3603) в объеме 25 мкл/лунку, затем добавляли анализируемое антитело, которое было разведено разбавителем образца до разных концентраций, в объеме 25 мкл/лунку, и затем добавляли 27,6 мкг/мл белков ANGPTL3 (человеческий ANGPTL3(17-170)-Flag-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 2), мышинный ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 5), ANGPTL3(17-460)-His яванского макака (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 7) и крысиный ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 8)) в объеме 25 мкл/лунку. Данный 96-луночный планшет хорошо встряхивали на шейкере и инкубировали в инкубаторе при температуре 37°C в течение 30 мин. Наконец, добавляли 20 мкМ субстрат (Sigma, 30058-10MG-F), который был разведен буфером для разведения, в объеме 25 мкл/лунку, и данный 96-луночный планшет хорошо встряхивали на шейкере и инкубировали в инкубаторе при температуре 37°C в течение 30 мин. Показания получали при возбуждении при 535 нм/испускании при 612 нм с использованием микропланшет-ридера Flexstation3. Концентрации и соответствующие данные по флуоресценции обрабатывали с использованием программы Graphpad Prism 5, и рассчитывали IC₅₀ (полумаксимальная ингибирующая концентрация). Результаты эксперимента показаны в Таблице 4. Данные результаты показывают то, что антитела по настоящему раскрытию имеют хорошие ингибирующие эффекты против фермента LPL.

Таблица 4. Активность антитела против ANGPTL3 в блокировании ингибирования LPL посредством ANGPTL3 разных видов

Антитело	IC ₅₀ (нМ)			
	Человеческий ANGPTL3	Мышиный ANGPTL3	ANGPTL3 яванского макака	Крысиный ANGPTL3
P8BG	75,3	41,5	53,6	132,2

4.4. Анализ Вiасоре антитела против ANGPTL3 и белков ANGPTL3

Для измерения аффинностей анализируемого антитела против ANGPTL3 в отношении человеческого, обезьяньего, крысиного и мышинного ANGPTL3 использовали Вiасоре. Данный способ является следующим:

Использовали биосенсорный чип на основе белка А (кат. № 29127556, GE) для аффинного захвата определенного количества анализируемого антитела, и затем обеспечивали протекание над поверхностью чипа определенных концентраций человеческого, обезьяньего, крысиного и мышинного антигенов ANGPTL3 (человеческий ANGPTL3 (R&D, 3829-AN), мышинный ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 5), ANGPTL3(17-460)-His яванского макака (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 7) и крысиного ANGPTL3(17-455)-His (последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 8)). Сигналы реакции выявляли в реальном времени с использованием прибора Biacore T200 с получением кривых связывания и диссоциации. После завершения диссоциации в каждом цикле биочип промывали и регенерировали с использованием регенерационного раствора глицина-соляной кислоты (кат. № BR-1003-54, GE), имеющего pH 1,5. Проточный буфер для данного эксперимента представлял собой 1× буфер HBS-EP (кат. № BR-1001-88, GE). Аппроксимацию проводили на данных, полученных из данного эксперимента, с использованием программы GE Biacore T200 evaluation (версия 3.0) с использованием модели Лангмюра (1:1) с получением значений аффинности. Результаты эксперимента показаны в Таблице 5. Данные результаты показывают то, что антитела против ANGPTL3 по настоящему раскрытию способны к связыванию с человеческим антигеном ANGPTL3, антигеном ANGPTL3 яванского макака, крысиным и мышинным антигенами ANGPTL3 с высокой аффинностью.

Таблица 5. Результаты анализа biacore для антител против ANGPTL3 и белков ANGPTL3

Антитело	Антиген	Константа связывания (1/Мс)	Константа диссоциации (1/с)	Аффинность (М)
P8G	Человеческий ANGPTL3	2,20E+06	3,33E-04	1,51E-10
	ANGPTL3 яванского макака	8,37E+06	4,97E-04	5,93E-11
	Мышинный ANGPTL3	9,70E+05	3,45E-04	3,55E-10
	Крысиный ANGPTL3	1,34E+06	3,35E-04	2,50E-10
P8BG	Человеческий ANGPTL3	6,14E+06	2,76E-04	4,50E-11
	ANGPTL3 яванского макака	5,18E+06	3,98E-04	7,69E-11
	Мышинный ANGPTL3	1,46E+06	4,20E-04	2,88E-10
	Крысиный ANGPTL3	1,21E+06	3,11E-04	2,57E-10

Пример 5: фармакодинамическая оценка антител против ANGPTL3 у крыс

5.1. Эксперимент по снижению уровня липидов антителом P8BG у крыс

Крыс SD для экспериментов (4-недельные крысы SD, SPF, примерно 100 г, самцы, приобретены у Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd.; № сертификата 20170005013017, SCXK (Shanghai) 2017-0005) акклиматизировали к лабораторным условиям (при цикле 12/12 часов света/темноты, температуре 23 плюс/минус 1°C, влажности 40-50%) в течение 1 недели, и всем животным давали стандартный стерильный мышинный корм и доступ без ограничений к пище и воде. За 7 суток до начала эксперимента, после голодания животных в течение 4 ч отбирали кровь из глазницы и центрифугировали при 3500 об./мин в течение 15 мин, и отбирали сыворотку. Концентрацию липидов (триглицеридов) в сыворотке определяли с использованием химической системы ADVIA 2400 (Siemens). Крыс делили на 6 групп из 6 по уровню триглицеридов (нерелевантный изотипический человеческий белок IgG (далее hlgG) в качестве группы негативного контроля, группа 3,5 мг/кг эвинакумаба (относительно структуры его последовательности, см. последовательность эвинакумаба в WHO Drug Information, Vol. 29, No. 3, 2015), группа 7 мг/кг эвинакумаба, группа 3,5 мг/кг P8BG, группа 1,75 мг/кг P8BG и группа 7 мг/кг P8BG) и осуществляли подкожную инъекцию один раз. В сутки 1, 5, 9, 13 и 16 после инъекций, после голодания данных групп крыс в течение 4 ч отбирали кровь и отделяли сыворотку. Концентрацию липидов (триглицеридов) в сыворотке определяли с использованием химической системы ADVIA 2400 (Siemens). Экспериментальные данные выражали как среднее плюс/минус стандартное отклонение (среднее плюс/минус SEM) и откладывали на графике с использованием программы Graphpad Prism5, и статистический анализ проводили с использованием TTEST.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 1 и в Таблице 6. По сравнению с группой негативного контроля через 1 сутки после введения уровень триглицеридов каждой группы обработки снижался, и в данных группах наблюдались статистические различия, за исключением группы 3,5 мг/кг эвинакумаба. Во время данного эксперимента уровень триглицеридов группы 7 мг/кг P8BG снижался максимум на 83,7%, уровень триглицеридов группы 3,5 мг/кг P8BG снижался максимум на 81,8%, и уровень триглицеридов группы 1,75 мг/кг P8BG снижался максимум на 68,7%; через 5 суток после введения все еще имелись статистические различия между снижениями уровней триглицеридов группы 3,5 мг/кг P8BG, группы 1,75 мг/кг P8BG и группы 7 мг/кг P8BG, тогда как не было

статистического различия между снижениями уровней группы 3,5 мг/кг эвинакумаба и группы 7 мг/кг эвинакумаба; через 9 суток после введения все еще имелось статистическое различие между снижениями уровней триглицеридов группы 7 мг/кг P8BG и группы 3,5 мг/кг P8BG. Это указывает на то, что в той же самой дозе P8BG имеет лучший и более длительный эффект снижения уровня триглицеридов, чем эвинакумаб. Кроме того, во время данного эксперимента масса тела животных в каждой группе была нормальной.

Таблица 6. Влияние антитела P8BG на триглицериды сыворотки у крыс

Антитело	Эвинакумаб		P8BG		
	7 мг/кг	3,5 мг/кг	7 мг/кг	3,5 мг/кг	1,75 мг/кг
Доза для подкожного введения	7 мг/кг	3,5 мг/кг	7 мг/кг	3,5 мг/кг	1,75 мг/кг
Исходные TG (мг/дл)	121,5±17,0	122,2±17,1	120,1±14,3	122,6±15,6	120,9±16,1
Минимальный уровень TG	131,1±12,5	109,7±16,7	27,6±3,1	34,2±4,7	72,6±10,9
Макс. ингиб. %	40,7%	13,1%	83,7%	81,8%	68,7%

(Примечание: Макс. ингиб. % представляет максимальное процентное снижение уровня липидов относительно TG (триглицериды) группы негативного контроля; мг/кг представляют мг/кг массы тела.)

5.2. Определение влияния *in vivo* антител против ANGPTL3 на концентрацию липидов в плазме у мышей c57bl/6 на диете с высоким содержанием жиров и высоким содержанием холестерина

Мышей c57bl/6 содержали в клетках, по 5 мышей/клетку (4-недельные мыши c57bl/6, SPF, примерно 16-18 г, самцы, приобретенные у Shanghai Cavens Laboratory Animal Co., Ltd.; № сертификата 201913812, SCXK (Jiangsu) 2016-0010). Мышей акклиматизировали к лабораторным условиям (при цикле 12/12 часов света/темноты, температуре 23 плюс/минус 1°C, влажности 40-50%) в течение 4 недель, и всех животных кормили обычным кормом и давали неограниченный доступ к пище и воде. Через 5 суток после предварительного отбора крови обычный корм заменяли на корм с высоким содержанием жиров и высоким содержанием холестерина (D12079B, приобретен у Jiangsu Xietong Pharmaceutical Bio-engineering Co., Ltd.) для кормления мышей до конца эксперимента. За 8 суток до начала эксперимента, после голодания животных в течение 4 ч отбирали кровь из глазницы и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 2 мин, и отбирали плазму. Концентрацию липидов в плазме определяли с использованием

химической системы ADVIA 2400 (Siemens). Мышей делили на 4 группы из 11 по уровню триглицеридов (группа негативного контроля hlgG, группа 25 мг/кг эвинакумаба, группа 25 мг/кг P8BG и группа 5 мг/кг P8BG) и осуществляли подкожную инъекцию один раз в неделю, и всего проводили 8 введений. В недели 5 2, 3, 5, 7, 9, 10 и 11 после начала эксперимента, после того, как мыши в каждой группе голодали в течение 4 ч, отбирали кровь из глазницы, и отбирали плазму. Концентрации липидов (триглицериды (TG), общий холестерин (TC) и холестерин LDL (липопротеин низкой плотности) (LDL-C)) в плазме определяли с использованием химической системы ADVIA 2400 (Siemens). Экспериментальные 10 данные выражали как среднее плюс/минус стандартное отклонение (среднее плюс/минус SEM), откладывали на графике с использованием программы Graphpad Prism5, и статистический анализ проводили с использованием TTEST.

Результаты показаны в Таблицах 7-9 и на ФИГ. 2-4. По сравнению с контрольной группой негативного контроля hlgG, группа 25 мг/кг P8BG 15 демонстрировала значимые снижения уровней TG, TC и LDL-C через 2, 3, 5 и 7 недель после начала эксперимента; группа 25 мг/кг эвинакумаба и группа 5 мг/кг P8BG демонстрировали снижения уровней TG, TC и LDL-C через 3, 5 и 7 недель после начала эксперимента. Через 9 недель после начала эксперимента только 20 две группы - группа 25 мг/кг P8BG и группа 5 мг/кг P8BG демонстрировали значимые снижения уровня триглицеридов по сравнению с группой негативного контроля hlgG. По сравнению с группой 25 мг/кг эвинакумаба, группа 25 мг/кг P8BG демонстрировала значимые снижения уровней триглицеридов и общего 25 холестерина в недели 2, 3 и 9 эксперимента; по сравнению с группой 25 мг/кг эвинакумаба, группа 25 мг/кг P8BG демонстрировала значимые снижения уровня LDL-C в недели 2 и 9 эксперимента. Во всем полном цикле эксперимента с недели 1 до недели 11 уровень TG группы 25 мг/кг эвинакумаба снижался до минимума – 40,5 плюс/минус 2,3 – снижение на 32,60% по сравнению с исходным уровнем TG; и TG группы 25 мг/кг P8BG снижались до минимума – 21,1 плюс/минус 1,3 – 30 снижение на 64,90% по сравнению с исходными TG. Это указывает на то, что антитело P8BG имеет лучший и более длительный эффект снижения уровня липидов, чем эвинакумаб.

Таблица 7. Влияние антител против ANGPTL3 на TG плазмы у мышей c57bl/6

Антитело	Эвинакумаб	P8BG		hlgG
Доза для еженедельного подкожного введения	25 мг/кг	25 мг/кг	5 мг/кг	25 мг/кг

Исходные TG (мг/дл)	60,1±3,2	60,1±4,1	60,1±3,8	60,0±6,2
Минимальный уровень TG	40,5±2,3	21,1±1,3	35,5±1,7	45,1±7,1
Макс. ингиб. %	32,6%	64,9%	40,9%	24,8%

(Примечание: макс. ингиб. % представляет максимальное процентное снижение уровня липидов относительно исходного уровня TG).

Таблица 8. Влияние антител против ANGPTL3 на LDL плазмы у мышей c57bl/6

Антитело	Эвинакумаб	P8BG	
Доза для еженедельного подкожного введения	25 мг/кг	25 мг/кг	5 мг/кг
Макс. ингиб. %	28,10%	52,10%	42,80%

5 (Примечание: макс. ингиб. % представляет максимальное процентное снижение уровня липидов относительно LDL группы негативного контроля).

Таблица 9. Влияние антител против ANGPTL3 на TC плазмы у мышей c57bl/6

Антитело	Эвинакумаб	P8BG	
Доза для еженедельного подкожного введения	25 мг/кг	25 мг/кг	5 мг/кг
Макс. ингиб. %	27,50%	47,90%	36,20%

10 (Примечание: макс. ингиб. % представляет максимальное процентное снижение уровня липидов относительно TC группы негативного контроля).

5.3. Определение влияния *in vivo* антител против ANGPTL3 на концентрацию липидов плазмы у мышей APOE

15 Мышей APOE содержали в клетках, по 2 мыши/клетку (8-недельные мыши APOE, SPF, примерно 22 г, самцы, приобретены у Shanghai Cavens Laboratory Animal Co., Ltd.; № сертификата 201917260, SCXK (Jiangsu) 2016-0010). Мышей акклиматизировали к лабораторным условиям (при цикле 12/12 часов
20 света/темноты, температуре 23 плюс/минус 1°C, влажности 40-50%) в течение 4 недель, и всех животных кормили кормом с высоким содержанием жиров (D12108C) и давали неограниченный доступ к пище и воде. За 7 суток до начала эксперимента, после голодания животных в течение 4 ч отбирали кровь из
25 глазницы и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 2 мин, и отбирали плазму. Концентрацию липидов в плазме определяли с использованием химической системы ADVIA 2400 (Siemens). Мышей делили на 5 групп из 8 по уровню триглицеридов (группа негативного контроля hlgG, группа 10 мг/кг

эвинакумаба, группа 5 мг/кг эвинакумаба, группа 10 мг/кг P8BG и группа 5 мг/кг P8BG) и осуществляли подкожную инъекцию один раз (см. Таблицу 6 относительно дозы для каждой группы). В сутки (сут.) 1, 7 и 11 после введения, после того, как данные группы мышей голодали в течение 4 ч, отбирали кровь из глазницы, и отбирали плазму. Концентрации липидов (триглицериды и холестерин HDL) в плазме определяли с использованием химической системы ADVIA 2400 (Siemens). Экспериментальные данные выражали как среднее плюс/минус стандартное отклонение (среднее плюс/минус SEM), откладывали на графике с использованием программы Graphpad Prism5, и статистический анализ проводили с использованием TTEST.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 5 и 6 и в Таблице 10. По сравнению с контрольной группой негативного контроля hlgG через 1 сутки после введения каждая группа обработки демонстрировала снижение уровня триглицеридов. Уровень триглицеридов группы эвинакумаба (10 мг/кг) снижался до минимума - 65,6 плюс/минус 5,4 мг/дл – 46,2%-ное снижение по сравнению с исходным значением TG; уровень триглицеридов группы эвинакумаба (5 мг/кг) снижался до минимума – 71,8 плюс/минус 3,3 мг/дл – 42,1%-ное снижение по сравнению с исходным значением TG; уровень триглицеридов группы P8BG (10 мг/кг) снижался до минимума – 33,3 плюс/минус 2,2 мг/дл – 72,9%-ное снижение по сравнению с исходным значением TG; уровень триглицеридов группы P8BG (5 мг/кг) снижался до минимума – 37,0 плюс/минус 1,7 мг/дл – 70,2%-ное снижение по сравнению с исходным значением TG. Кроме того, данные Результаты эксперимента демонстрируют то, что через 1 сутки после введения уровень HDL-C плазмы группы 10 мг/кг P8BG возрастал, а уровень HDL-C плазмы группы 10 мг/кг эвинакумаба снижался. Однако в эксперименте по снижению уровня липидов уменьшение уровня HDL-C обычно является нежелательным при снижении уровня липидов.

Таблица 10. Влияние антител против ANGPTL3 на триглицериды плазмы у мышей APOE

Антитело	Эвинакумаб		P8BG		hlgG
	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	
Доза для подкожного введения	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг	5 мг/кг	10 мг/кг
Исходный уровень TG (мг/дл)	122,0±8,8	123,9±17,1	122,8±10,7	124,0±20,8	120,5±14,9
Минимальный уровень TG	65,6±5,4	71,8±3,3	33,3±2,2	37,0±1,7	146,7±21,6

Макс. ингиб. %	46,20%	42,10%	72,90%	70,20%	-21,70%
----------------	--------	--------	--------	--------	---------

(Примечание: макс. ингиб. % представляет максимальное процентное снижение уровня липидов относительно исходного уровня TG).

Пример 6: фармакокинетическая оценка антител против ANGPTL3

5 6.1. Фармакокинетический эксперимент с антителами против ANGPTL3 у мышей

Мышей C57BL/6, весящих 18-24 г (приобретенных у Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.), акклиматизировали к лабораторным условиям (при цикле 12/12 часов света/темноты, температуре 16-26°C, 10 относительной влажности 40-70%) в течение не менее, чем 3 суток. Во время акклиматизации мышам давали неограниченный доступ к корму и воде. За сутки до начала эксперимента мышей C57BL/6 нумеровали и рандомизировали в группы из 3. В сутки эксперимента данным группам мышей внутривенно инъецировали анализируемые лекарственные средства P8BG и эвинакумаб. Доза введения 15 составляла 10 мг/кг, и объем инъекции составлял 5 мл/кг.

Отбирали 0,1 мл образцы цельной крови от групп введения до введения и через 5 мин, 8 ч, 1 сут., 2 сут., 4 сут., 7 сут., 10 сут., 14 сут., 21 сут. и 28 сут. после введения, и не добавляли противосвертывающее средство. Отобранные образцы 20 крови оставляли при 4°C на 30 мин и центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Супернатанты (сыворотка) переносили в пробирки Эппендорфа и хранили при -80°C.

Концентрацию антитела в сыворотке определяли посредством ELISA, и фармакокинетические параметры рассчитывали для анализируемых 25 лекарственных средств посредством программы Winnolin. Главные полученные фармакокинетические результаты показаны в Таблице 11 и на ФИГ. 7. Результаты эксперимента демонстрируют то, что антитело P8BG по настоящему раскрытию имеет более высокий период полувыведения у мышей, чем эвинакумаб позитивного контроля.

Таблица 11. Фармакокинетика антител против ANGPTL3 у мышей

Антитело	P8BG	Эвинакумаб
Путь введения	в.в.	в.в.
Доза (мг/кг)	10	10
$t_{1/2}$ (ч)	131,4±18,8	71,1±6,1

$t_{1/2}$ (сут.)	5,47±0,78	2,96±0,25
AUC _{0-∞} (ч*мкг/мл)	23272±2887	16904±4481

(Примечание: AUC_{0-∞}: площадь под кривой концентрация лекарственного средства в плазме-время; $t_{1/2}$ (ч): период полувыведения (в часах); $t_{1/2}$ (сут.): период полувыведения (в сутках); в.в.: внутривенная инъекция).

5 6.2. Фармакокинетическая оценка антител против ANGPTL3 у яванских макаков

Использовали яванских макаков, весящих 3-4 кг (приобретены у Guangdong Qianyan Biological Science and Technology Co., Ltd.). Данных животных подвергали карантину по меньшей мере на 14 суток и адаптивному кормлению перед использованием в эксперименте. Данных животных содержали в клетках из нержавеющей стали, не больше, чем по 2 животных в клетке. Комнатная температура комнаты для животных контролировалась на уровне 18°C-26°C, и относительная влажность составляла 40%-70%. Животных содержали при цикле 12 часов света-темноты. Во время эксперимента животным давали неограниченный доступ к воде. 6 яванских макаков рандомизировали в 2 группы из 3 согласно биохимическим показателям. Данным группам подкожно инъецировали анализируемые лекарственные средства P8BG и эвинакумаб. Доза введения составляла 10 мг/кг, и объем инъекции составлял 2 мл/кг.

После разделения на группы животные голодали в течение ночи. Примерно 2 мл образцы крови отбирали из вены нижней конечности перед введением и через 1 час (ч), 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч, 1 сут., 3 сут., 5 сут., 7 сут., 10 сут., 14 сут., 21 сут., 28 сут., 35 сут., 42 сут., 49 сут. и 56 сут. после начала введения. Образцы крови помещали в пробирки для отбора крови, содержащие сепарирующий гель, оставляли постоять при комнатной температуре в течение 30 мин и центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин. Супернатанты отбирали, аликвотировали в 2 чистые пробирки Эппендорфа и временно хранили при -70°C (приведенную выше методику завершали в пределах 2 ч с момента отбора крови). Концентрацию антитела в сыворотке определяли посредством ELISA, и фармакокинетические параметры рассчитывали для анализируемых лекарственных средств посредством программы Winnolin. Главные полученные фармакокинетические результаты показаны в Таблице 12 и на ФИГ. 8. Результаты эксперимента демонстрируют то, что антитело P8BG по настоящему раскрытию

имеет более высокий период полувыведения у яванских макаков, чем эвинакумаб позитивного контроля.

Таблица 12. Фармакокинетика антител против ANGPTL3 у яванских макаков

	P8BG	Эвинакумаб
Доза (мг/кг)	10	10
Путь введения	п.к.	п.к.
$t_{1/2}$ (ч)	324,7±115,3	157,7±28,6
$t_{1/2}$ (сут.)	13,5±4,8	6,6±1,2
AUC 0-∞ (мкг/мл*ч)	44243±7404	38027±252

5 (Примечание: AUC0-∞: площадь под кривой концентрация лекарственного средства в плазме-время; $t_{1/2}$ (ч): период полувыведения (в часах); $t_{1/2}$ (сут.): период полувыведения (в сутках); п.к.: подкожная инъекция).

Пример 7: способ получения типичной фармацевтической композиции (препарата) антитела

10 Стадия 1: маточный раствор, содержащий антитело против ANGPTL3, получали с использованием антитела против ANGPTL3 и стабилизатора. После фильтрования отбирали и анализировали полученный в ходе процесса контрольный образец. Данный анализ показал то, что маточный раствор был безмикробным. Данный маточный раствор пропускали через 0,22 мкм PVDF
15 (поливинилиденфторид) фильтр, и отбирали фильтрат.

20 Стадия 2: корректировали количество для заполнения, и осуществляли заполнение (количество для заполнения и упаковочный материал подлежали определению) и закупорку. Отбирали контрольные образцы в ходе процесса в начале заполнения, во время заполнения и в конце заполнения и осуществляли выявление на различия заполняющего количества.

Стадия 3: запускали закупоривающую колпачками установку, устанавливали алюминиевые колпачки и осуществляли окклюзия колпачками.

25 Стадия 4: осуществляли визуальную проверку для подтверждения того, что продукты не имеют недостатков, таких как неточное количество для заполнения. Печатали этикетки флаконов и помещали на флаконы; печатали картонные этикетки, складывали картонные коробки, осуществляли упаковку и картонные этикетки помещали на картонные коробки.

Антителом против ANGPTL3, используемым в Примерах 7-13, было антитело P8BG, последовательность тяжелой цепи которого изложена в SEQ ID NO: 21, и последовательность легкой цепи которого изложена в SEQ ID NO: 22.

5 **Пример 8: скрининг на значения pH препаратов антитела против ANGPTL3**

10 Готовили следующие буферы, и получали препараты антител с концентрацией антитела против ANGPTL3 1,0 мг/мл. Посредством измерения температуры плавления (T_m) и температуры начала теплового разложения (Tonset) образцов исследовали термостабильность антитела против ANGPTL3 при разных условиях pH. Посредством измерения температуры агрегации (Tagg) и размера частиц (радиус) образцов исследовали коллоидную стабильность антитела против ANGPTL3 при условиях разного pH.

- 1) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 4,2
- 15 2) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 4,6
- 3) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 5,0
- 4) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 5,4
- 5) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 5,8
- 6) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 6,2
- 20 7) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 6,6
- 8) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 7,0
- 9) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 7,4
- 10) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 7,8
- 11) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 8,2
- 25 12) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 8,6

Таблица 13. Результаты скрининга значения pH антител против ANGPTL3

№	Расчетный pH	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)	Tonset (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)	Размер частиц (нм)	%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

(Примечание: %PD представляет коэффициент дисперсии, и чем меньше значение, тем более однообразным является распределение размера частиц; N/A представляет «не применимо»).

5 Данные результаты демонстрируют то, что: при pH 5,0 плюс/минус 0,4 значения Tagg и Tonset антитела против ANGPTL3 были относительно высокими; при pH 6,2 плюс/минус 0,4 размеры частиц были относительно маленькими, свидетельствуя о том, что распределения были более однородными; относительно высокие значения Tm1 указывают на то, что антитело имеет относительно хорошую термостабильность и коллоидную стабильность при pH 5,0 плюс/минус 10 0,4 и 6,2 плюс/минус 0,4.

Пример 9: скрининг буферных систем и подтверждение буферных систем для препаратов антитела против ANGPTL3

9.1. Скрининг буферных систем с pH 6,0

15 Для приготовления препаратов, содержащих 50 мг/мл антитела против ANGPTL3 отбирали буферные системы 10 мМ дигидрофосфата натрия-гидрофосфата динатрия, pH 6,0 и 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, pH 6,0, и отбирали образцы для исследований стабильности при высокой температуре (40°C) и комнатной температуре (25°C):

- 20 1) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 6,0
2) 10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, pH 6,0

Таблица 14. Результаты по стабильности 1 скрининга буферных систем (pH 6,0) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, pH 6,0	57,5	67,2	58,4	64,1	65,4
10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, pH 6,0	54,4	69,0	58,3	67,9	67,6

25 (Примечание: в данной таблице показаны результаты по стабильности время-0 скрининга буферных систем (pH 6,0) антитела против ANGPTL3)

Таблица 15. Результаты по стабильности 2 скрининга буферных систем (pH 6,0) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	Внешний вид	Размер частиц	%PD
------------------	----------------------	-------------	---------------	-----

			(нм)	
10 мМ дигидрофос- фат натрия- гидрофосфат динатрия, рН 6,0	Время 0	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	7,1	4,3
	25°С-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	7,1	6,3
	25°С-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,1	5,2
	25°С-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,2	6,3
	40°С-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,3	8,8
	40°С-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,5	13,2
	40°С-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,9	17,5
10 мМ гистидин- гистидина гидрохлорид рН 6,0	Время 0	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	6,3	3,1
	25°С-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	6,8	4,9
	25°С-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	6,7	6,3
	25°С-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	6,7	4,4
	40°С-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	6,7	5,1
	40°С-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	6,8	5,7
	40°С-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых волокон	7,0	10,6

(Примечание: 1 нед. представляет 1 неделю; размер частиц отражает коллоидную стабильность; %PD представляет коэффициент дисперсии).

Таблица 16. Результаты по стабильности 3 скрининга буферных систем (рН 6,0) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	ГФ		iCIEF		
		% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика
10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, рН 6,0	Время 0	5,1	94,9	15,3	43,4	41,3
	25°С-1 нед.	5,1	94,9	15,5	44,2	40,4
	25°С-2 нед.	5,1	94,9	16,6	43,2	40,3
	25°С-4 нед.	5,2	94,8	17,1	45,0	38,0
	40°С-1 нед.	5,6	94,4	16,9	44,7	38,4
	40°С-2 нед.	6,0	93,5	20,1	42,8	37,1
	40°С-4 нед.	7,1	92,2	27,6	35,5	36,9
10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорид рН 6,0	Время 0	4,6	95,4	14,9	43,9	41,2
	25°С-1 нед.	4,5	95,5	15,9	44,8	39,4
	25°С-2 нед.	4,5	95,5	16,3	45,2	38,6
	25°С-4 нед.	4,6	95,4	16,6	48,3	35,1
	40°С-1 нед.	5,0	95,0	16,7	44,9	38,4
	40°С-2 нед.	5,3	94,2	18,5	43,7	37,8
	40°С-4 нед.	6,1	93,2	25,7	35,6	38,7

(Примечание: 1 нед. обозначает 1 неделю).

- 5 Данные результаты демонстрируют то, что: при тех же самых условиях исследования антитело против ANGPTL3 имеет более высокое значение Tagg, меньший размер частиц и меньшее содержание агрегатов в буферной системе 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,0, чем в буферной системе 10 мМ дигидрофосфата натрия-гидрофосфата динатрия, рН 6,0, указывая то, что
- 10 антитело против ANGPTL3 имеет лучшую стабильность в буферной системе 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,0.

9.2. Скрининг буферных систем с рН 6,6

- 15 Для приготовления препаратов, содержащих 50 мг/мл антитела против ANGPTL3, выбирали буферные системы 10 мМ дигидрофосфата натрия-гидрофосфата динатрия, рН 6,6 и 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН

6,6, и отбирали образцы для исследований стабильности при высокой температуре (40°C) и комнатной температуре (25°C):

- 1) 10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, рН 6,6
- 2) 10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, рН 6,6

5 Таблица 17. Результаты по стабильности 1 скрининга буферных систем (рН 6,6) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, рН 6,6	59,5	66,2	59,2	63,2	64,7
10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, рН 6,6	59,0	67,0	55,8	65,5	65,3

(Примечание: в данной таблице показаны результаты по стабильности время-0 скрининга буферных систем (рН 6,6) антитела против ANGPTL3).

10 Таблица 18. Результаты по стабильности 2 скрининга буферных систем (рН 6,6) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	Внешний вид	Размер частиц (нм)	%PD
10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, рН 6,6	Время 0	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	6,8	6,8
	25°C-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	6,8	5,2
	25°C-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	6,7	7,1
	25°C-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	6,8	6,1
	40°C-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,0	10,0
	40°C-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых	7,1	13,6

		волокон		
	40°C-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	7,7	20,7
10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, рН 6,6	Время 0	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	7,8	3,4
	25°C-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	8,0	4,1
	25°C-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	7,8	3,8
	25°C-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое число белых частиц	7,4	10,8
	40°C-1 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	8,2	7,7
	40°C-2 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	8,1	6,5
	40°C-4 нед.	Бесцветное, в значительной степени опалесцентное, большое количество белых волокон	6,8	18,5

(Примечание: 1 нед. представляет 1 неделю; размер частиц отражает коллоидную стабильность; %PD представляет коэффициент дисперсии).

5 Таблица 19. Результаты по стабильности 3 скрининга буферных систем (рН 6,6) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	ГФ		iCIEF		
		% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика
10 мМ дигидрофосфат натрия-гидрофосфат динатрия, рН 6,6	Время 0	4,7	95,3	15,5	43,9	40,6
	25°C-1 нед.	4,7	95,3	16,6	43,5	39,9
	25°C-2 нед.	4,6	95,4	16,5	43,4	40,1
	25°C-4 нед.	4,8	95,2	17,1	44,2	38,7
	40°C-1 нед.	5,1	94,8	19,2	43,5	37,4
	40°C-2 нед.	5,6	94,3	22,2	43,1	34,7

	40°C-4 нед.	6,6	92,8	32,5	34,1	33,4
10 мМ гистидин- гистидина гидрохлорид, рН 6,6	Время 0	4,5	95,5	15,2	44,3	40,5
	25°C-1 нед.	4,5	95,5	15,4	44,6	40,0
	25°C-2 нед.	4,4	95,6	16,0	43,7	40,3
	25°C-4 нед.	4,5	95,4	16,2	44,8	38,9
	40°C-1 нед.	4,8	95,1	17,4	43,0	39,6
	40°C-2 нед.	5,1	94,5	20,1	42,9	37,0
	40°C-4 нед.	5,8	93,5	30,3	38,0	31,6

(Примечание: 1 нед. предстает 1 неделю).

Данные результаты демонстрируют то, что: при тех же самых условиях исследования антитело против ANGPTL3 имеет меньшее значение Tonset, большее значение Tagg и больший размер частиц, но имеет относительно меньшее содержание агрегатов, относительно большее содержание мономеров и относительно большее содержание главного пика в буферной системе 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,6, чем в буферной системе 10 мМ дигидрофосфата натрия-гидрофосфата динатрия, рН 6,6. В общем, считается, что антитело против ANGPTL3 имеет лучшую стабильность в буферной системе 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,6.

9.3. Скрининг буферных систем с рН 4,6

Для приготовления препаратов антитела, содержащих 50 мг/мл белка, выбирали буферные системы 10 мМ янтарной кислоты-сукцинат натрия, рН 4,6 и 10 мМ уксусной кислоты-ацетат натрия, рН 4,6, и отбирали образцы для исследований стабильности при высокой температуре (40°C) и комнатной температуре (25°C):

- 1) 10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 4,6
- 2) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 4,6

Таблица 20. Результаты по стабильности 1 скрининга буферных систем (рН 4,6) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 4,6	63,3	72,2	61,4	N/A	68,2
10 мМ уксусная кислота-ацетат	60,5	71,4	65,1	N/A	67,9

натрия, рН 4,6					
----------------	--	--	--	--	--

(Примечание: в данной таблице показаны результаты по стабильности время-0 скрининга буферных систем (рН 4,6) антитела против ANGPTL3; N/A представляет «не применимо»).

5 Таблица 21. Результаты по стабильности 2 скрининга буферных систем (рН 4,6) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	Внешний вид	Размер частиц (нм)	%PD
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 4,6	Время 0	Бесцветное, прозрачное, большое число белых частиц	3,1	34,9
	25°С-1 нед.	Бесцветное, прозрачное, большое число белых частиц	3,4	48,7
	25°С-2 нед.	Бесцветное, прозрачное, маленькое число белых частиц	3,2	26,2
	25°С-4 нед.	Бесцветное, прозрачное, крошечное число белых частиц	3,3	35,6
	40°С-1 нед.	Бесцветное, прозрачное, маленькое число белых частиц	4,1	N/A
	40°С-2 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, маленькое число белых частиц	4,5	N/A
	40°С-4 нед.	Бесцветное, прозрачное, крошечное число белых частиц	5,1	N/A
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 4,6	Время 0	Бесцветное, прозрачное, большое число белых частиц	2,7	23,1
	25°С-1 нед.	Бесцветное, прозрачное, большое число белых частиц	2,7	21,4
	25°С-2 нед.	Бесцветное, прозрачное, пренебрежимо малое количество белых волокон	2,7	17,7
	25°С-4 нед.	Бесцветное, прозрачное, нет видимых белковых частиц	2,7	24,3
	40°С-1 нед.	Бесцветное, прозрачное, крошечное число белых частиц	3,1	44,1
	40°С-2 нед.	Бесцветное, прозрачное, маленькое число белых частиц	3,3	51,1
	40°С-4 нед.	Бесцветное, прозрачное, крошечное число белых частиц	4,0	N/A

(Примечание: 1 нед. представляет 1 неделю; размер частиц отражает коллоидную стабильность; %PD представляет коэффициент дисперсии; N/A представляет «не применимо»).

Таблица 22. Результаты по стабильности 3 скрининга буферных систем (рН 4,6) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	ГФ		iCIEF		
		% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 4,6	Время 0	5,0	95,0	15,4	42,7	41,9
	25°С-1 нед.	5,1	94,9	16,1	43,8	40,2
	25°С-2 нед.	5,0	95,0	16,0	43,7	40,3
	25°С-4 нед.	5,2	94,7	17,3	44,1	38,6
	40°С-1 нед.	19,9	79,1	14,4	35,0	50,6
	40°С-2 нед.	29,1	68,9	13,6	29,6	56,8
	40°С-4 нед.	40,7	55,1	13,2	19,6	67,3
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 4,6	Время 0	4,9	95,1	15,5	43,6	40,9
	25°С-1 нед.	5,0	95,0	16,3	46,3	37,5
	25°С-2 нед.	5,0	95,0	17,1	47,0	35,9
	25°С-4 нед.	5,1	94,8	18,7	49,6	31,7
	40°С-1 нед.	17,4	81,3	12,2	35,0	52,9
	40°С-2 нед.	24,9	72,6	13,5	25,3	61,2
	40°С-4 нед.	35,6	59,4	11,1	18,3	70,5

(Примечание: 1 нед. представляет 1 неделю).

Данные результаты демонстрируют то, что: при тех же самых условиях исследования антитело против ANGPTL3 имеет меньшее значение T_{m1} , но имеет большее значение T_{onset} , меньший размер частиц и меньшее содержание агрегатов в буферной системе 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 4,6, чем в буферной системе 10 мМ янтарной кислоты-сукцината натрия, рН 4,6, указывая то, что антитело против ANGPTL3 имеет лучшую стабильность в буферной системе 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 4,6.

9.4. Скрининг буферных систем с рН 5,0

Для приготовления препаратов, содержащих 50 мг/мл антитела против ANGPTL3, выбирали буферные системы 10 мМ янтарной кислоты-сукцината натрия, рН 5,0 и 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0, и отбирали образцы для исследований стабильности при высокой температуре (40°С) и комнатной температуре (25°С):

- 1) 10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 5,0
- 2) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 5,0

Таблица 23. Результаты по стабильности 1 скрининга буферных систем (рН 5,0) антитела против ANGPTL3

Буферная система	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)	Tonset (°C)	Tagg 266 (°C)	Tagg 473 (°C)
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, pH 5,0	48,7	69,6	49,7	N/A	67,7
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0	51,8	71,2	60,6	N/A	68,0

(Примечание: в данной таблице показаны результаты по стабильности время-0 скрининга буферных систем (pH 5,0); N/A представляет «не применимо»).

Таблица 24. Результаты по стабильности 2 скрининга буферных систем (pH 5,0) антитела против ANGPTL3

5

Буферная система	Условия исследования	Внешний вид	Размер частиц (нм)	%PD
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, pH 5,0	Время 0	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	5,4	16,8
	25°C-1 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	5,3	18,9
	25°C-2 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое количество белых волокон	5,3	18,0
	25°C-4 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое количество белых волокон	5,5	27,8
	40°C-1 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	5,9	33,6
	40°C-2 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое количество белых волокон	6,1	35,9
	40°C-4 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое количество белых волокон	7,0	40,9
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0	Время 0	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	3,8	22,8
	25°C-1 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	3,9	25,8
	25°C-2 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	3,9	24,0
	25°C-4 нед.	Бесцветное, прозрачное, маленькое число белых частиц	4,0	29,2
	40°C-1 нед.	Бесцветное, слегка	4,1	36,0

		опалесцентное, большое число белых частиц		
	40°C-2 нед.	Бесцветное, слегка опалесцентное, большое число белых частиц	4,3	50,2
	40°C-4 нед.	Бесцветное, прозрачное, маленькое число белых частиц	4,6	53,9

(Примечание: 1 нед. представляет 1 неделю; размер частиц отражает коллоидную стабильность; %PD представляет коэффициент дисперсии).

Таблица 25. Результаты по стабильности 3 скрининга буферных систем (рН 5,0) антитела против ANGPTL3

5

Буферная система	Условия исследования	ГФ		iCIEF		
		% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 5,0	Время 0	4,8	95,2	15,6	43,0	41,5
	25°C-1 нед.	4,8	95,2	15,6	44,4	39,9
	25°C-2 нед.	4,8	95,2	16,1	44,6	39,3
	25°C-4 нед.	4,9	95,0	17,5	44,1	38,4
	40°C-1 нед.	9,9	89,6	16,4	40,6	43,0
	40°C-2 нед.	13,3	86,0	16,0	36,6	47,4
	40°C-4 нед.	21,2	77,3	21,8	27,3	50,8
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 5,0	Время 0	4,7	95,3	15,2	43,9	41,0
	25°C-1 нед.	4,7	95,3	16,6	47,3	36,2
	25°C-2 нед.	4,7	95,3	18,0	48,4	33,6
	25°C-4 нед.	4,8	95,2	19,5	54,0	26,5
	40°C-1 нед.	7,4	92,1	15,2	42,4	42,4
	40°C-2 нед.	9,4	89,8	14,9	41,3	43,9
	40°C-4 нед.	14,1	84,2	20,3	30,1	49,6

(Примечание: 1 нед. представляет 1 неделю).

Данные результаты демонстрируют то, что: при тех же самых условиях исследования антитело против ANGPTL3 имеет большее значение Tm_1 , большее значение $Tonset$, большее значение $Tagg$, меньший размер частиц, меньшее содержание агрегатов, большее содержание мономеров и большее содержание главного пика в буферной системе 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0, чем в буферной системе 10 мМ янтарной кислоты-сукцината натрия, рН 5,0, указывая на то, что антитело против ANGPTL3 имеет лучшую стабильность в буферной системе 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0.

Результаты скрининга буферных систем антитела против ANGPTL3 демонстрируют то, что: антитело против ANGPTL3 имеет лучший внешний вид,

относительно высокое значение T_{m1} , относительно высокое значение T_{agg} и относительно высокое значение T_{onset} в буферных системах 10 мМ янтарной кислоты-сукцината натрия, рН 4,6, 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 4,6 и 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0, но при высокой температуре 40°C значимо возросло содержание агрегатов; антитело против ANGPTL3 имеет относительно плохой внешний вид, относительно высокое значение T_{m1} , относительно высокое значение T_{agg} и относительно высокое значение T_{onset} в буферной системе 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,0, и при условиях высокой температуры не было значимого увеличения содержания агрегатов. Принимая то, что образец, использованный при скрининге буферных систем, представлял собой смешанный образец, использовали образец моноклонального антитела для осуществления подтверждения буферной системы для дальнейшего подтверждения конечного рН и буферной системы.

9.5. Подтверждение буферных систем для препаратов антитела против ANGPTL3

Выбирали буферные системы 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,0, 10 мМ янтарной кислоты-сукцината натрия, рН 4,6, 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 4,6 и 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0 для получения препаратов, содержащих 50 мг/мл антитела против ANGPTL3, и отбирали образцы для исследований стабильности при высокой температуре (60°C и 40°C):

- 1) 10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, рН 6,0;
- 2) 10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 4,6;
- 3) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 4,6 и
- 4) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 5,0.

Таблица 26. Результаты 1 подтверждения буферной системы препарата антитела против ANGPTL3

Буферная система	Условия исследования	Внешний вид	Размер частиц (нм)	%PD
10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, рН 6,0	Время 0	Бесцветный, в значительной степени опалесцентный, большое число белых частиц	9,0	Много пиков
	60°C-3 ч	Бесцветный, в значительной степени опалесцентный, нет видимых частиц	Незавершенный	

	40°C-4 сут.	Бесцветный, в значительной степени опалесцентный, маленькое число белых частиц	NT	NT
	40°C-7 сут.	Бесцветный, в значительной степени опалесцентный, большое число белых частиц	7,7	31,7
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, pH 4,6	Время 0	Бесцветный, слегка опалесцентный, большое число белых частиц	7,2	Много пиков
	60°C-3 ч	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц	7,2	57,0
	40°C-4 сут.	Бесцветный, слегка опалесцентный, малое число белых частиц	NT	NT
	40°C-7 сут.	Бесцветный, прозрачный, большое число белых частиц	5,9	18,0
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, pH 4,6	Время 0	Бесцветный, прозрачный, малое число белых частиц	2,6	41,9
	60°C-3 ч	Бесцветный, прозрачный, нет видимых частиц	3,6	Много пиков
	40°C-4 сут.	Бесцветный, прозрачный, нет видимых частиц	NT	NT
	40°C-7 сут.	Бесцветный, прозрачный, большое число белых волокон	3,9	17,7
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0	Время 0	Бесцветный, слегка опалесцентный, большое число белых частиц	5,1	25,3
	60°C-3 ч	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц	8,0	30,5
	40°C-4 сут.	Бесцветный, слегка опалесцентный, малое количество видимых волокон	NT	NT
	40°C-7 сут.	Бесцветный, слегка опалесцентный, большое число белых частиц	5,1	24,9

(Примечание: ч представляет час(ы), сут. представляет сутки, размер частиц отражает коллоидную стабильность; %PD представляется коэффициент дисперсии; NT представляет «не анализировали»; «незавершенный» представляет неуспех инструментального выявления из-за плохого образца).

5

Таблица 27. Результаты 2 подтверждения буферной системы препарата антитела против ANGPTL3

Буферная	Условия	ГФ	iCIEF	Актив-
----------	---------	----	-------	--------

система	исследования	% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика	НОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ (%)
10 мМ гистидин-гистидина гидрохлорид, рН 6,0	Время 0	5,0	95,0	16,7	71,8	11,5	109
	60°C-3 ч	28,5	71,5	16,6	50,1	33,3	75
	40°C-4 сут.	5,3	94,7	17,6	69,7	12,7	NT
	40°C-7 сут.	5,3	94,7	18,7	68,9	12,5	81
10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, рН 4,6	Время 0	6,9	93,1	15,0	71,5	13,5	107
	60°C-3 ч	93,8	6,1	6,8	28,2	65,0	65
	40°C-4 сут.	18,0	82,0	17,0	64,4	18,7	NT
	40°C-7 сут.	22,6	77,3	18,2	59,6	22,2	80
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 4,6	Время 0	7,3	92,7	15,8	71,4	12,8	106
	60°C-3 ч	88,3	11,7	8,6	34,9	56,5	77
	40°C-4 сут.	9,0	90,9	16,6	68,2	15,2	NT
	40°C-7 сут.	10,2	89,7	18,0	64,8	17,2	90
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 5,0	Время 0	5,1	94,9	16,2	72,3	11,5	110
	60°C-3 ч	89,2	10,8	10,0	36,7	53,3	67
	40°C-4 сут.	5,8	94,2	17,0	69,7	13,2	NT
	40°C-7 сут.	6,2	93,8	18,3	68,1	13,6	85

(Примечание: ч представляет час(ы); сут. представляет сутки; NT представляет «не анализировали»).

5 Данные результаты демонстрируют то, что антитело против ANGPTL3 имеет лучшую стабильность в буферных системах 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,0 и 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0, чем в буферных системах 10 мМ янтарной кислоты-сукцината натрия, рН 4,6 и 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 4,6; когда использовали буферную систему 10 мМ гистидина-гистидина гидрохлорида, рН 6,0, данный препарат был опалесцентным, и после добавления полисорбата 80 внешний вид не улучшался.

10

Пример 10: скрининг на концентрации сахара для препаратов антитела против ANGPTL3

Буферную систему 10 мМ уксусной кислоты-ацетата натрия, рН 5,0 выбирали для приготовления буферных систем или препаратов антитела против ANGPTL3 с разными концентрациями сахара:

- 1) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, рН 5,0;
- 5 2) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 60 мг/мл сахарозы, рН 5,0;
- 3) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 70 мг/мл сахарозы, рН 5,0;
- 4) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 75
10 мг/мл сахарозы, рН 5,0;
- 5) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 80 мг/мл сахарозы, рН 5,0;
- 6) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 90 мг/мл сахарозы, рН 5,0 и
- 15 7) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 80 мг/мл сахарозы, рН 5,0.

Все приведенные выше 1) – 7) содержали 100 мг/мл антитела против ANGPTL3.

20 Результаты по осмотическому давлению для данных образцов показаны в таблице, приведенной ниже:

Таблица 28. Результаты по осмотическому давлению для разных концентраций сахарозы для антитела против ANGPTL3

№	Концентрация сахарозы	Концентрация белка	Концентрация полисорбата 80	Осмотическое давление (мОсм/кг)
1)	0 мг/мл	100 мг/мл	0 мг/мл	28
2)	60 мг/мл	0 мг/мл	0,2 мг/мл	217
3)	70 мг/мл	0 мг/мл	0,2 мг/мл	239
4)	75 мг/мл	0 мг/мл	0,2 мг/мл	257
5)	80 мг/мл	0 мг/мл	0,2 мг/мл	270
6)	90 мг/мл	0 мг/мл	0,2 мг/мл	322
7)	80 мг/мл	100 мг/мл	0,2 мг/мл	317

Согласно результатам по осмотическому давлению пригодная концентрация сахарозы составляет 60-90 мг/мл; например, концентрацию сахарозы 75 мг/мл

используют для приготовления изотоничных препаратов антитела против ANGPTL3.

Пример 11: скрининг на концентрации поверхностно-активного вещества для для препаратов антитела против ANGPTL3

10 мМ уксусную кислоту-ацетат натрия выбирали для приготовления препаратов, содержащих 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы и разные концентрации полисорбата 80, и исследовали стабильность данного антитела при условиях встряхивания, замораживания-оттаивания, освещения и высокой температуры.

1) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,1 мг/мл полисорбата 80, 75 мг/мл сахарозы, 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, pH 5,0

2) 10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия, 0,4 мг/мл полисорбата 80, 75 мг/мл сахарозы, 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, pH 5,0

Таблица 29. Результаты по стабильности 1 для препаратов с разными концентрациями поверхностно-активного вещества

Композиция формулы	Время стояния	Внешний вид	Размер частиц (нм)	%PD
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,1 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, pH 5,0	Время 0	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,4	27,6
	Встряхивание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,4	25,5
	3 цикла замораживания-оттаивания -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,8	20,0
	5 циклов замораживания-оттаивания -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,5	55,0
	Освещение в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,3	23,7
	Освещение в течение 10	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых	4,4	27,3

	сут., 5000 Лк, 25°C	частиц белка		
	40°C-1 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,5	26,7
	40°C-2 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,6	39,7
	40°C-4 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,9	Много пиков
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,4 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, pH 5,0	Время 0	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,3	23,9
	Встряхива- ние в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,7	52,8
	3 цикла заморажива- ния- оттаивания -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,1	44,8
	5 циклов заморажива- ния- оттаивания -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,3	23,8
	Освещение в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,4	29,3
	Освещение в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,4	24,5
	40°C-1 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,6	34,5
	40°C-2 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,4	25,4
	40°C-4 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,7	34,2

(Примечание: ч представляет час(ы); нед. представляет неделю(ли); RT представляет комнатную температуру; размер частиц отражает коллоидную

стабильность; %PD представляет коэффициент дисперсии; NT представляет «не анализировали»).

Таблица 30. Результаты по стабильности 2 для препаратов в разными концентрациями поверхностно-активного вещества

Композиция формулы	Время стояния	ГФ		iCIEF		
		% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,1 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, pH 5,0	Время 0	2,8	97,2	16,9	78,1	5,0
	Встряхивание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	2,9	97,1	15,1	79,3	5,5
	3 цикла замораживания-оттаивания -35°C/RT	2,8	97,2	15,5	78,8	5,7
	5 циклов замораживания-оттаивания -35°C/RT	2,8	97,2	15,3	78,8	5,8
	Освещение в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	3,2	96,8	17,1	77,3	5,6
	Освещение в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C	3,3	96,7	17,1	78,0	4,9
	40°C-1 нед.	3,4	96,6	20,2	72,0	7,8
	40°C-2 нед.	4,1	95,8	22,1	68,9	9,0
40°C-4 нед.	5,9	93,9	30,4	59,5	10,1	
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,4 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, pH 5,0	Время 0	2,8	97,2	16,4	78,8	4,8
	Встряхивание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	2,8	97,2	15,9	77,3	6,8
	3 цикла замораживания-оттаивания -35°C/RT	2,8	97,2	15,3	78,9	5,8
	5 циклов замораживания-оттаивания	2,8	97,2	16,1	78,4	5,5

	-35°C/RT					
	Освещение в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	3,1	96,9	17,1	76,7	6,2
	Освещение в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C	3,3	96,6	18,0	76,6	5,4
	40°C-1 нед.	3,4	96,6	19,9	73,4	6,7
	40°C-2 нед.	4,2	95,7	21,6	70,7	7,7
	40°C-4 нед.	6,0	93,8	30,2	59,8	10,1

(Примечание: ч представляет час(ы); нед. представляет неделю(ли); RT представляет комнатную температуру).

Данные результаты показывают то, что: в препарате антитела против ANGPTL3, содержащем 0,1 мг/мл или 0,4 мг/мл полисорбата 80, не было значимого различия стабильности при условиях встряхивания, замораживания-оттаивания, освещения и высокой температуры. Таким образом, интервал пригодной концентрации для полисорбата 80 в препаратах антитела против ANGPTL3 составляет 0,1 мг/мл-0,4 мг/мл.

10 **Пример 12: влияние pH препарата на стабильность**

10 mM уксусную кислоту-ацетат натрия выбирали для приготовления препаратов, содержащих 75 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80 и 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, со значениями pH 5,0 и 5,4, соответственно, и исследовали стабильность данных препаратов антитела при условиях встряхивания, замораживания-оттаивания, освещения и высокой температуры.

1) 10 mM уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 75 мг/мл сахарозы, 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, pH 5,0.

2) 10 mM уксусная кислота-ацетат натрия, 0,2 мг/мл полисорбата 80, 75 мг/мл сахарозы, 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, pH 5,4.

20 **Таблица 31. Результаты 1 исследования влияния pH препарата на стабильность**

Композиция формулы	Время стояния	Внешний вид	Размер частиц (нм)	%PD
10 mM уксусная кислота-ацетат натрия + 0,2	Время 0	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,4	Много пиков

мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, рН 5,0	Встряхи- вание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	4,8	Много пиков
	3 цикла заморажи- вания- оттаива- ния -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,0	Много пиков
	5 циклов заморажи- вания- оттаива- ния -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,0	Много пиков
	Освеще- ние в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	7,1	Много пиков
	Освеще- ние в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,4	Много пиков
	40°C-1 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,3	Много пиков
	40°C-2 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,3	Много пиков
	40°C-4 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	5,6	Много пиков
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,2 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, рН 5,4	Время 0	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,1	29,6
	Встряхи- вание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,4	36,6
	3 цикла заморажи- вания- оттаива-	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,5	36,3

	ния -35°C/RT			
	5 циклов заморажи- вания- оттаива- ния -35°C/RT	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	8,1	Много пиков
	Освеще- ние в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	8,1	Много пиков
	Освеще- ние в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет или малое число видимых частиц белка	6,3	30,5
	40°C-1 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,4	34,3
	40°C-2 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,6	38,3
	40°C-4 нед.	Бесцветный, слегка опалесцентный, нет видимых частиц белка	6,9	48,7

(Примечание: ч представляет час(ы); нед. представляет неделю(ли); RT представляет комнатную температуру; размер частиц отражает коллоидную стабильность; %PD представляет коэффициент дисперсии).

5

Таблица 32. Результаты 2 исследования влияния pH препарата на стабильность

Композиция формулы	Время стояния	ГФ		iCIEF		
		% агрегатов	% мономеров	% кислотного пика	% главного пика	% основного пика
10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,2 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл	Время 0	3,6	96,4	18,9	74,0	7,1
	Встряхивание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT	3,6	96,3	18,2	75,2	6,6
	3 цикла замораживания-оттаивания -35°C/RT	3,6	96,4	18,1	75,2	6,7

белка, рН 5,0	5 циклов замораживания-оттаивания -35°C/RT	3,6	96,4	17,6	76,1	6,3
	Освещение в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C	4,0	95,9	18,4	73,3	8,4
	Освещение в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C	4,3	95,6	19,2	73,1	7,8
	40°C-1 нед.	5,1	94,9	21,2	69,7	9,1
	40°C-2 нед.	6,3	93,6	25,3	64,7	10,0
	40°C-4 нед.	10,4	89,4	38,4	50,8	10,7
	10 мМ уксусная кислота-ацетат натрия + 0,2 мг/мл полисорбата 80 + 75 мг/мл сахарозы + 100 мг/мл белка, рН 5,4	Время 0	3,1	96,9	16,8	78,3
Встряхивание в течение 48 ч, 200 об./мин, RT		3,2	96,8	15,5	79,5	5,0
3 цикла замораживания-оттаивания -35°C/RT		3,2	96,8	15,3	78,8	5,9
5 циклов замораживания-оттаивания -35°C/RT		3,2	96,8	16,3	77,3	6,4
Освещение в течение 5 сут., 5000 Лк, 25°C		3,6	96,4	18,1	76,0	5,9
Освещение в течение 10 сут., 5000 Лк, 25°C		3,8	96,2	19,0	74,7	6,3
40°C-1 нед.		3,7	96,2	20,0	73,7	6,4
40°C-2 нед.		4,3	95,7	23,4	67,3	9,3
40°C-4 нед.		5,3	94,5	31,2	59,3	9,5

(Примечание: ч представляет час(ы); нед. представляет неделю(ли); RT представляет комнатную температуру).

Данные результаты показывают то, что: по сравнению со временем 0 препараты с рН 5,0 и рН 5,4 демонстрировали аналогичные тенденции изменения белка при условиях встряхивания, замораживания-оттаивания, освещения и

высокой температуры. Таким образом, определили то, что интервал pH препаратов антитела против ANGPTL3 составляет 5,0-5,4.

0,1 мг/мл полисорбата 80 и 0,4 мг/мл полисорбата 80 демонстрировали мало влияния на стабильность антитела таким образом, что пригодный интервал концентрации полисорбата 80 в препаратах составляет 0,1-0,4 мг/мл; значение pH 5,0 и 5,4 демонстрировало мало влияния на стабильность антитела таким образом, что пригодный интервал pH для препаратов составляет 5,0-5,4; определили, что концентрация антитела против ANGPTL3 составляет 100 мг/мл.

10 **Пример 13: альтернативные формулы**

Кроме того, согласно настоящему раскрытию дополнительно предложены фармацевтические препараты антитела против ANGPTL3 других формул, включая следующие:

15 (1) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0;

 (2) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0;

 (3) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0;

20 (4) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,2;

 (5) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,2;

25 (6) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,2;

 (7) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,4;

 (8) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,4;

30 (9) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,4;

 (10) 80 мг/мл, 100 мг/мл, 120 мг/мл или 150 мг/мл антитела против ANGPTL3, 75 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80 и 10 mM буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0-5,4; и

(11) 100 мг/мл антитела против ANGPTL3, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 75 мг/мл, 80 мг/мл, 85 мг/мл или 90 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата 80 и 10 мМ буфер уксусная кислота-ацетат натрия, pH 5,0-5,4,

но не ограничивающиеся ими.

- 5 Данные Результаты эксперимента демонстрируют то, что препараты антитела против ANGPTL3 приведенных выше формул имеют хорошую стабильность; приведенные выше формулы можно применять для получения лекарственных средств на основе антитела против ANGPTL3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против ангиопозтин-подобного белка 3 (ANGPTL3) или его антигенсвязывающий фрагмент и буфер, где указанный буфер выбран из любого из буферов уксусная кислота-ацетат натрия, янтарная кислота-сукцинат натрия, гистидина гидрохлорид и лимонная кислота-цитрат натрия, и предпочтительно представляет собой буфер уксусная кислота-ацетат натрия или янтарная кислота-сукцинат натрия; при этом указанное антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, соответственно; и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 соответственно.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой буфер имеет pH от 4,0 до 7,0, предпочтительно от 5,0 до 5,4 и наиболее предпочтительно примерно 5,2.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, в которой концентрация буфера составляет от 5 мМ до 40 мМ, предпочтительно от 5 мМ до 20 мМ и наиболее предпочтительно примерно 10 мМ.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, в которой концентрация антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента составляет от 10 мг/мл до 200 мг/мл, предпочтительно от 80 мг/мл до 120 мг/мл и наиболее предпочтительно примерно 100 мг/мл.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество, где указанное поверхностно-активное вещество предпочтительно представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20, более предпочтительно полисорбат 80.

6. Фармацевтическая композиция по п. 5, в которой концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,05 мг/мл до 0,6 мг/мл, предпочтительно от 0,1 мг/мл до 0,4 мг/мл и более предпочтительно примерно 0,2 мг/мл.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-6, дополнительно содержащая стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой сахар; предпочтительно указанный сахар выбран из группы, состоящей из сахарозы,

трегалозы, маннита и сорбита; более предпочтительно указанный сахар представляет собой сахарозу.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, в которой концентрация сахара составляет от 60 мг/мл до 90 мг/мл, предпочтительно от 70 мг/мл до 80 мг/мл и наиболее предпочтительно примерно 75 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, содержащая:

(a) от 10 мг/мл до 200 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) 5 мМ – 30 мМ ацетатный буфер,

(c) от 60 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

(d) от 0,05 мг/мл до 0,6 мг/мл полисорбата 80,

где указанная фармацевтическая композиция предпочтительно имеет рН от 4,5 до 6,5 и более предпочтительно имеет рН от 5,0 до 5,4.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, содержащая:

(a) примерно 100 мг/мл антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента,

(b) 5 мМ – 15 мМ буфер уксусная кислота-ацетат натрия,

(c) от 60 мг/мл до 90 мг/мл сахарозы и

(d) от 0,1 мг/мл до 0,4 мг/мл полисорбата 80,

где указанная фармацевтическая композиция предпочтительно имеет рН от 5,0 до 5,4 и более предпочтительно имеет рН примерно 5,2.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, в которой антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент является мышинным, химерным или гуманизированным антителом; при этом предпочтительно последовательности FR легкой и тяжелой цепи гуманизированного антитела происходят из FR легкой и тяжелой цепи человеческой зародышевой линии соответственно.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, в которой аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 17 или имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с ней, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 18 или имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с ней.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-12, в которой антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где: аминокислотная

последовательность тяжелой цепи изложена в SEQ ID NO: 21 или имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с ней, и аминокислотная последовательность легкой цепи изложена в SEQ ID NO: 22 или имеет по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности с ней.

14. Способ получения фармацевтической композиции по любому из пп. 1-13, включающий стадию, на которой маточный раствор антитела против ANGPTL3 или его антигенсвязывающего фрагмента подвергают замене буфера, при этом указанный буфер предпочтительно представляет собой буфер на основе уксусной кислоты-ацетата натрия.

15. Лиофилизированный препарат, содержащий антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанный лиофилизированный препарат получен лиофилизацией фармацевтической композиции по любому из пп. 1-13; при этом предпочтительно лиофилизация включает последовательные стадии предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки.

16. Восстановленный раствор, содержащий антитело против ANGPTL3 или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанный восстановленный раствор получен посредством восстановления лиофилизированного препарата по п. 15.

17. Изделие, содержащее контейнер, где указанный контейнер содержит фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-13 или лиофилизированный препарат по п. 15, или восстановленный раствор по п. 16.

18. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-13 или лиофилизированного препарата по п. 15, или восстановленного раствора по п. 16 для получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения заболевания или расстройства;

где предпочтительно указанное заболевание или расстройство выбрано из одного или более из гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний или расстройств, рака или опухолей, неопластических связанных с ангиогенезом заболеваний или расстройств и воспалительных заболеваний или расстройств;

более предпочтительно указанное заболевание или расстройство выбрано из одного или более из следующих: атеросклеротическая дислипидемия, диабетическая дислипидемия, гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, хиломикронемия, смешанная дислипидемия, липодистрофия, липоатрофия, атеросклероз, аневризма, гипертензия, стенокардия, инсульт, заболевания сосудов мозга, застойная сердечная недостаточность, заболевание коронарных артерий, инфаркт миокарда, заболевание периферических сосудов, острый панкреатит,

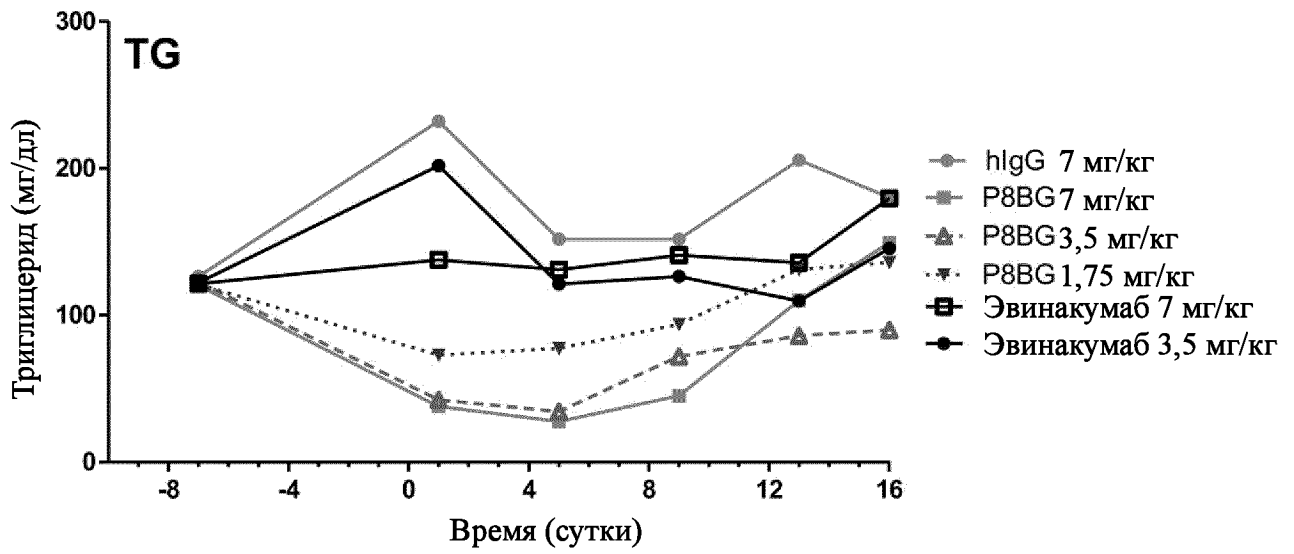
неалкогольный стеатогепатит (NASH), отклонения содержания глюкозы в крови, возрастная макулодистрофия, окклюзия центральной вены или ветвей вены сетчатки, диабетическая ретинопатия, ретинопатия недоношенных, артрит, ревматоидный артрит (RA) и псориаз.

19. Способ лечения и/или предупреждения заболевания или расстройства, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по любому из пп. 1-13 или восстановленного раствора по п. 16;

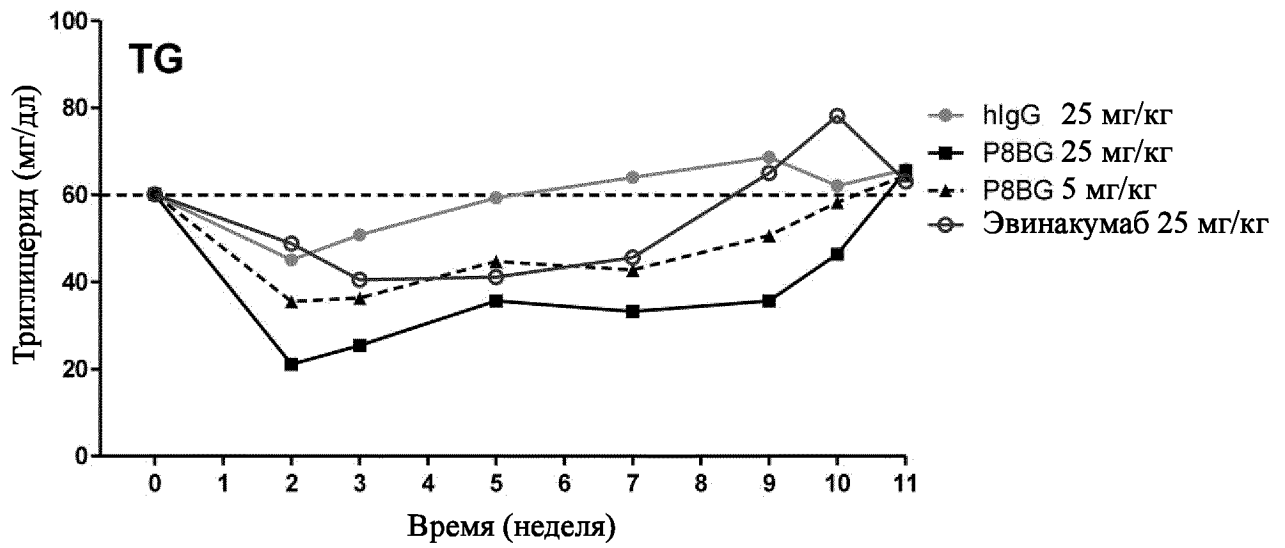
где предпочтительно данное заболевание или расстройство выбрано из одного или более чем одного из гиперлипидемии, гиперлипопротеинемии, дислипидемии, сердечно-сосудистых заболеваний или расстройств, рака или опухолей, ненеопластических связанных с ангиогенезом заболеваний или расстройств и воспалительных заболеваний или расстройств;

более предпочтительно данное заболевание или расстройство выбрано из одного или более чем одного из следующих: атеросклеротическая дислипидемия, диабетическая дислипидемия, гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, хиломикронемия, смешанная дислипидемия, липодистрофия, липоатрофия, атеросклероз, аневризма, гипертензия, стенокардия, инсульт, заболевания сосудов мозга, застойная сердечная недостаточность, заболевание коронарных артерий, инфаркт миокарда, заболевание периферических сосудов, острый панкреатит, неалкогольный стеатогепатит (NASH), отклонения содержания глюкозы в крови, возрастная макулодистрофия, окклюзия центральной вены или ветвей вены сетчатки, диабетическая ретинопатия, ретинопатия недоношенных, артрит, ревматоидный артрит (RA) и псориаз.

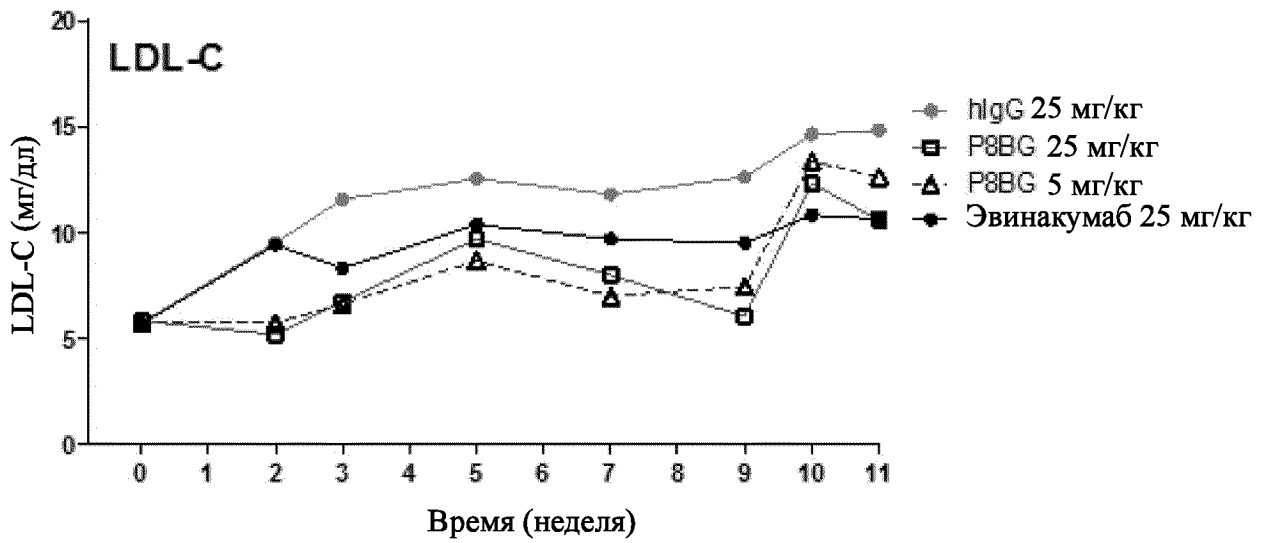
1



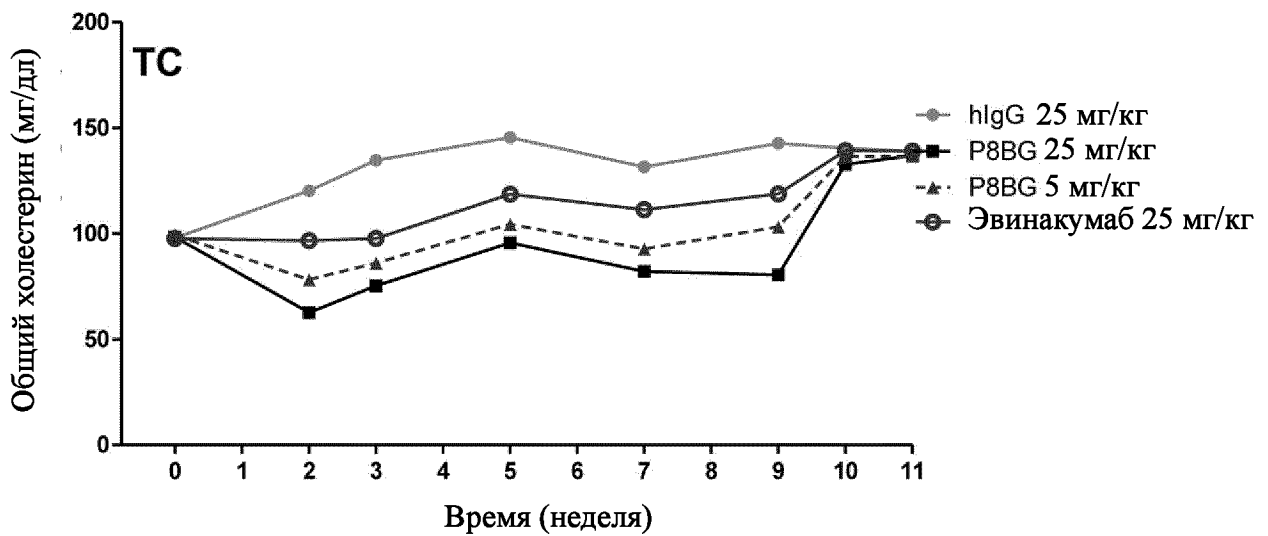
ФИГ. 1



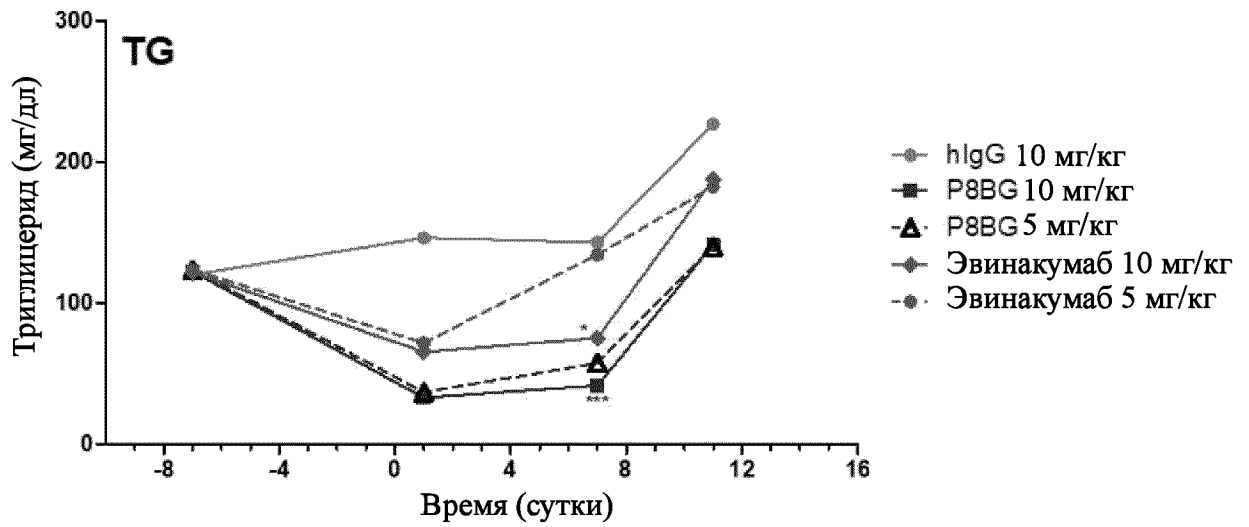
ФИГ. 2



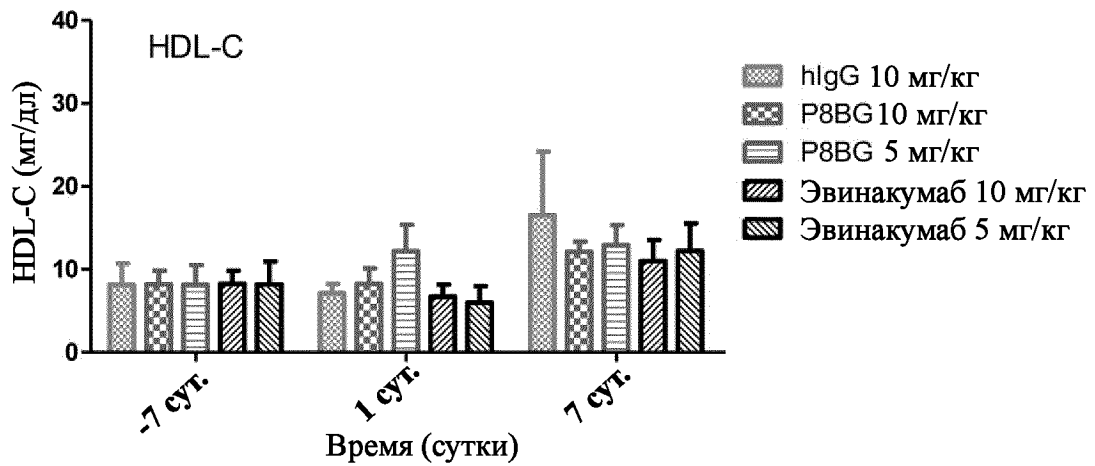
ФИГ. 3



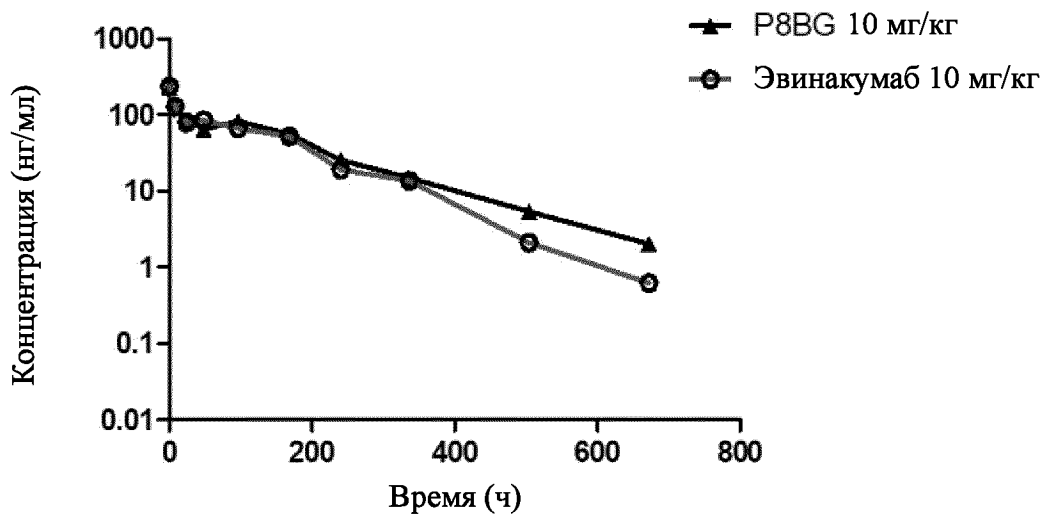
ФИГ. 4



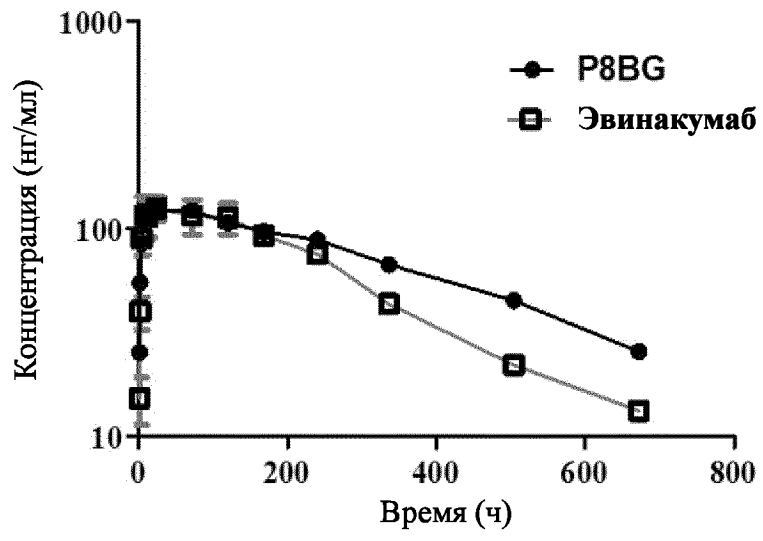
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7

**ФИГ. 8**