



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109689685 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201780055144.9

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(22)申请日 2017.07.07

11256

代理人 陈文平 袁元

(30)优先权数据

62/360,084 2016.07.08 US

62/491,591 2017.04.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.07

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 3/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2017/054125 2017.07.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/007999 EN 2018.01.11

(71)申请人 斯塔滕生物技术有限公司

地址 荷兰奈梅亨

(72)发明人 P·达西尔瓦-贾迪尼 H·德哈德

J·A·兰德罗

权利要求书4页 说明书53页

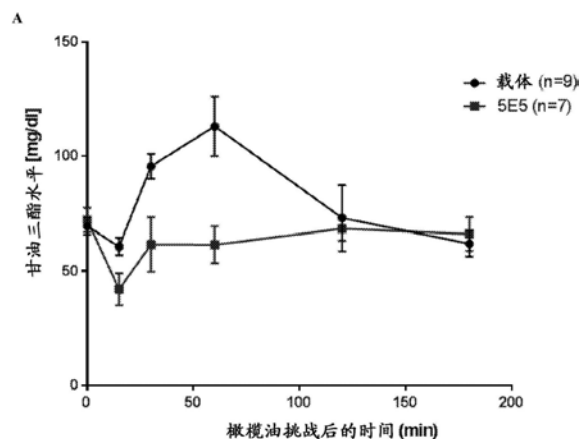
序列表88页 附图26页

(54)发明名称

抗APOC3抗体及其使用方法

(57)摘要

本公开提供了特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)并拮抗ApoC3功能的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物,编码这些抗体的核酸,用于制备这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。



1. 一种分离的抗体,其特异性结合ApoC3并减弱ApoC3抑制肝细胞摄取极低密度脂蛋白(VLDL)的能力。
2. 权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。
3. 权利要求1或2所述的分离的抗体,其中所述抗体能够增加受试者中ApoB从血液清除的速率。
4. 前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够降低受试者血液中ApoB的水平。
5. 前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的VLDL脂解的能力。
6. 前述权利要求中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制ApoC3与脂质的结合。
7. 权利要求1-5中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够结合脂质结合的ApoC3。
8. 一种分离的抗体,其特异性结合ApoC3,其中所述抗体结合SEQ ID NO:2 [GWVTDGFSSLK]所示氨基酸序列内的表位。
9. 权利要求8所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:2的1、4、6、7、9或10位的氨基酸中的至少一个。
10. 权利要求8所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:2的4和9位的氨基酸。
11. 权利要求8所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:2的4、6和9位的氨基酸。
12. 权利要求8所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:2的1、4、6和9位的氨基酸。
13. 权利要求8所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:2的1、4、6、7、9和10位的氨基酸。
14. 权利要求8-13中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的VLDL脂解的能力。
15. 权利要求8-14中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制ApoC3与脂质的结合。
16. 一种分离的抗体,其特异性结合ApoC3,其中所述抗体结合SEQ ID NO:3 [FSEFWDLDPE]所示氨基酸序列内的表位。
17. 权利要求16所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:3的2、5、6、8或10位的氨基酸中的至少一个。
18. 权利要求16所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:3的5和6位的氨基酸。
19. 权利要求16所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:3的2、5、6和8位的氨基酸。
20. 权利要求16所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:3的10位的氨基酸。
21. 权利要求16所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:3的6、8和10位的氨基酸。
22. 权利要求16所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:3的6和8位的氨基

酸。

23. 权利要求16-22中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够结合脂质结合的ApoC3。

24. 权利要求16-23中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体减弱ApoC3抑制肝细胞摄取极低密度脂蛋白(VLDL)的能力。

25. 权利要求16-24中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。

26. 权利要求16-25中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够增加受试者中ApoB从血液清除的速率。

27. 权利要求16-26中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够降低受试者血液中ApoB的水平。

28. 一种特异性结合ApoC3的分离的抗体,其包含具有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,和具有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,5,6,73,74和75;7,8,9,76,77和78;10,11,12,79,80和81;13,14,15,82,83和84;16,17,18,85,86和87;19,20,21,88,83和89;22,23,24,90,91和92;25,26,27,82,93和94;28,29,30,95,96和97;16,31,32,98,99和100;33,34,35,101,99和102;25,36,37,103,104和105;38,39,40,82,106和107;41,42,43,108,109和110;7,8,9,111,83和113;47,48,49,82,114和115;50,51,52,116,117和118;53,54,55,119,120和121;56,57,58,122,123和124;59,60,61,125,83和126;62,63,64,127,128和129;65,66,67,82,114和130;68,69,70,131,132和133;或68,71,72,124,135和136。

29. 一种特异性结合ApoC3的分离的抗体,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:137-160的氨基酸序列。

30. 一种特异性结合ApoC3的分离的抗体,所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:161-183和151的氨基酸序列。

31. 一种特异性结合ApoC3的分离的抗体,所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。

32. 一种分离的抗体,其与权利要求28-31中任一项所述的抗体竞争结合ApoC3。

33. 一种分离的抗体,其与权利要求28-31中任一项所述的抗体结合ApoC3的相同表位。

34. 权利要求8-33中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体减弱ApoC3抑制肝细胞摄取极低密度脂蛋白(VLDL)的能力。

35. 权利要求8-34中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。

36. 权利要求8-35中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够增加受试者中ApoB从血液清除的速率。

37. 权利要求8-36中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够降低受试者血液中

ApoB的水平。

38. 权利要求8-37中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的VLDL脂解的能力。

39. 权利要求8-38中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制ApoC3与脂质的结合。

40. 权利要求8-38中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体能够结合脂质结合的ApoC3。

41. 一种药物组合物,其包含前述权利要求中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

42. 一种编码前述权利要求中任一项所述的抗体的重链可变区或轻链可变区的多核苷酸。

43. 一种表达载体,其包含权利要求42所述的多核苷酸。

44. 一种宿主细胞,其包含权利要求43所述的表达载体。

45. 一种用于产生结合ApoC3的抗体的方法,所述方法包括在允许表达所述抗体的条件下培养权利要求44所述的宿主细胞。

46. 一种用于抑制受试者血液中ApoC3活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-41中任一项所述的抗体或药物组合物。

47. 一种用于降低受试者血液中甘油三酯水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-41中任一项所述的抗体或药物组合物。

48. 一种用于抑制受试者的餐后脂血症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-41中任一项所述的抗体或药物组合物。

49. 一种用于治疗受试者的高甘油三酯血症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-41中任一项所述的抗体或药物组合物。

50. 一种用于治疗受试者的乳糜微粒血症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-41中任一项所述的抗体或药物组合物。

51. 一种用于降低患有高甘油三酯血症的受试者的心血管疾病风险的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-41中任一项所述的抗体或药物组合物。

52. 权利要求51所述的方法,其中所述心血管疾病是心肌梗塞。

53. 权利要求51所述的方法,其中所述心血管疾病是心绞痛。

54. 权利要求51所述的方法,其中所述心血管疾病是中风。

55. 权利要求51所述的方法,其中所述心血管疾病是动脉粥样硬化。

56. 权利要求46-55中任一项所述的方法,其中所述抗体降低所述受试者血液中乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平。

57. 权利要求46-56中任一项所述的方法,其中所述受试者正接受另外的降脂剂。

58. 权利要求57所述的方法,其中所述另外的降脂剂是HMG-CoA还原酶抑制剂。

59. 权利要求58所述的方法,其中所述HMG-CoA还原酶抑制剂是阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀或辛伐他汀。

60. 权利要求57所述的方法,其中所述另外的降脂剂是PCSK9抑制剂。

61. 权利要求60所述的方法,其中所述PCSK9抑制剂是阿利库单抗、依伏库单抗或

bococizumab。

62. 权利要求57所述的方法,其中所述另外的降脂剂是依泽替米贝。

63. 权利要求57所述的方法,其中所述另外的降脂剂是依泽替米贝和HMG-CoA还原酶抑制剂的组合。

64. 权利要求57所述的方法,其中所述另外的降脂剂是依泽替米贝、HMG-CoA还原酶抑制剂和PCSK9抑制剂的组合。

抗APOC3抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2016年7月8日提交的美国临时申请号62/360,084;以及于2017年4月28日提交的美国临时申请号62/491,591的权益,其各自通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及特异性结合ApoC3 (例如人ApoC3) 的抗体及其使用方法。

背景技术

[0004] 血液甘油三酯水平升高(高甘油三酯血症)是动脉粥样硬化的致病因素,并且增加心血管事件如心血管死亡、心绞痛、心肌梗塞和中风的风险。

[0005] ApoC3是在血液中以非常高的浓度(大于10 μ M)循环的蛋白质,其主要结合富甘油三酯脂蛋白(triglyceride rich lipoprotein,TRL)、TRL残余物和高密度脂蛋白。ApoC3看起来是血液甘油三酯水平的重要调节剂。例如,已经显示在人中ApoC3水平与血液甘油三酯水平正相关,其中ApoC3水平升高与高甘油三酯血症相关。此外,已经显示ApoC3抑制脂蛋白脂酶(水解TRL中的甘油三酯的酶)的活性,并且还抑制TRL残余物的肝摄取,这两者都引起血液甘油三酯水平的升高。

[0006] 存在若干经批准用于治疗高甘油三酯血症的疗法(例如,贝特类、烟酸和 ω -3脂肪酸)。然而,这些疗法在降低血浆甘油三酯方面仅较小地有效。因此,本领域需要用于降低血浆甘油三酯的改进疗法。

发明内容

[0007] 本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如人ApoC3) 并抑制ApoC3功能的抗体(例如,分离的抗体)。还提供了包含这些抗体的药物组合物,编码这些抗体的核酸,用于制备这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体可以减弱ApoC3抑制肝细胞摄取TRL的能力。因此,所公开的抗ApoC3抗体可用于治疗和预防高甘油三酯血症和相关疾病(例如心血管疾病和胰腺炎)。

[0008] 因此,在一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3并减弱ApoC3抑制肝细胞摄取极低密度脂蛋白(VLDL)的能力的抗体。在某些实施方式中,所述抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。在某些实施方式中,所述抗体能够增加受试者中ApoB从血液清除的速率。在某些实施方式中,所述抗体能够降低受试者血液中ApoB的水平。在某些实施方式中,所述抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的VLDL脂解的能力。在某些实施方式中,所述抗体抑制ApoC3与脂质的结合。在某些实施方式中,所述抗体能够结合脂质结合的ApoC3。

[0009] 本文公开了若干不同类型的抗ApoC3抗体,每种抗体结合ApoC3的不同的新表位并具有不同的功能特性。例如,在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体结合SEQ ID NO:3 [FSEFWDLDP]所示的氨基酸序列内的表位,并且能够结合脂质结合的ApoC3。或者,在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体结合SEQ ID NO:2 [GWVTDGFSSLK]所示的氨基酸序列

内的表位,并抑制ApoC3与脂质的结合。

[0010] 因此,在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3的抗体,其中所述抗体结合SEQ ID NO:2[GWVTDGFSSLK]所示氨基酸序列内的表位。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:2的1、4、6、7、9或10位的氨基酸中的至少一个。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:2的4和9位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:2的4、6和9位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:2的1、4、6和9位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:2的1、4、6、7、9和10位的氨基酸。在某些实施方式中,所述抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的VLDL脂解的能力。在某些实施方式中,所述抗体抑制ApoC3与脂质的结合。

[0011] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3的抗体,其中所述抗体结合SEQ ID NO:3[FSEFWDLDP]所示的氨基酸序列内的表位。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:3的2、5、6、8或10位的氨基酸中的至少一个。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:3的5和6位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:3的2、5、6和8位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:3的10位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:3的6、8和10位的氨基酸。在某些实施方式中,所述表位包含SEQ ID NO:3的6和8位的氨基酸。在某些实施方式中,所述抗体能够结合脂质结合的ApoC3。在某些实施方式中,所述抗体减弱ApoC3抑制肝细胞摄取极低密度脂蛋白(VLDL)的能力。在某些实施方式中,所述抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。在某些实施方式中,所述抗体能够增加受试者中ApoB从血液清除的速率。在某些实施方式中,所述抗体能够降低受试者血液中ApoB的水平。

[0012] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3的抗体,其包含具有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,和具有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,5,6,73,74和75;7,8,9,76,77和78;10,11,12,79,80和81;13,14,15,82,83和84;16,17,18,85,86和87;19,20,21,88,83和89;22,23,24,90,91和92;25,26,27,82,93和94;28,29,30,95,96和97;16,31,32,98,99和100;33,34,35,101,99和102;25,36,37,103,104和105;38,39,40,82,106和107;41,42,43,108,109和110;7,8,9,111,83和113;47,48,49,82,114和115;50,51,52,116,117和118;53,54,55,119,120和121;56,57,58,122,123和124;59,60,61,125,83和126;62,63,64,127,128和129;65,66,67,82,114和130;68,69,70,131,132和133;或68,71,72,124,135和136。

[0013] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3的抗体,所述抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:137-160的氨基酸序列。在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3的抗体,所述抗体包含轻链可变区,所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:161-183和151的氨基酸序列。在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3的抗体,所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区和所述轻链可变区分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。

[0014] 在另一个方面中,本公开提供了与包含具有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,和具有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区的抗体竞争结合ApoC3的抗体,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,5,6,73,74和75;7,8,9,76,77和78;10,11,12,79,80和81;13,14,15,82,83和84;16,17,18,85,86和87;19,20,21,88,83和89;22,23,24,90,91和92;25,26,27,82,93和94;28,29,30,95,96和97;16,31,32,98,99和100;33,34,35,101,99和102;25,36,37,103,104和105;38,39,40,82,106和107;41,42,43,108,109和110;7,8,9,111,83和113;47,48,49,82,114和115;50,51,52,116,117和118;53,54,55,119,120和121;56,57,58,122,123和124;59,60,61,125,83和126;62,63,64,127,128和129;65,66,67,82,114和130;68,69,70,131,132和133;或68,71,72,124,135和136。

[0015] 在另一个方面中,本公开提供了与包含重链可变区的抗体竞争结合ApoC3的抗体,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:137-160的氨基酸序列。在另一个方面中,本公开提供了与包含轻链可变区的抗体竞争结合ApoC3的抗体,所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:161-183和151的氨基酸序列。在另一个方面中,本公开提供了与包含重链可变区和轻链可变区的抗体竞争结合ApoC3的抗体,其中所述重链可变区和所述轻链可变区分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID No:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。

[0016] 在另一个方面中,本公开提供了与包含具有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,和具有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区的抗体结合相同的ApoC3表位的抗体,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,5,6,73,74和75;7,8,9,76,77和78;10,11,12,79,80和81;13,14,15,82,83和84;16,17,18,85,86和87;19,20,21,88,83和89;22,23,24,90,91和92;25,26,27,82,93和94;28,29,30,95,96和97;16,31,32,98,99和100;33,34,35,101,99和102;25,36,37,103,104和105;38,39,40,82,106和107;41,42,43,108,109和110;7,8,9,111,83和113;47,48,49,82,114和115;50,51,52,116,117和118;53,54,55,119,120和121;56,57,58,122,123和124;59,60,61,125,83和126;62,63,64,127,128和129;65,66,67,82,114和130;68,69,70,131,132和133;或68,71,72,124,135和136。

[0017] 在另一个方面中,本公开提供了与包含重链可变区的抗体结合相同的ApoC3表位的抗体,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:137-160的氨基酸序列。在另一个方面中,本公开提供了与包含轻链可变区的抗体结合相同的ApoC3表位的抗体,所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:161-183和151的氨基酸序列。在另一个方面中,本公开提供了与包含重链可变区和轻链可变区的抗体结合相同的ApoC3表位的抗体,其中所述重链可变区和轻链可变区分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。

[0018] 在某些实施方式中,本文公开的抗体减弱ApoC3抑制肝细胞摄取极低密度脂蛋白

(VLDL)的能力。在某些实施方式中,所述抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。在某些实施方式中,所述抗体能够增加受试者中ApoB从血液清除的速率。在某些实施方式中,所述抗体能够降低受试者血液中ApoB的水平。在某些实施方式中,所述抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的VLDL脂解的能力。在某些实施方式中,所述抗体抑制ApoC3与脂质的结合。在某些实施方式中,所述抗体能够结合脂质结合的ApoC3。

[0019] 在另一个方面中,本申请提供了药物组合物,其包含如本文公开的抗体和药学上可接受的载体。

[0020] 在另一个方面中,本申请提供了编码如本文公开的抗体的重链可变区或轻链可变区的多核苷酸(例如,分离的多核苷酸)。在另一个方面中,本申请提供了包含所述多核苷酸的表达载体。在另一个方面中,本申请提供了包含所述表达载体的宿主细胞。在另一个方面中,本申请提供了用于产生结合ApoC3的抗体的方法,所述方法包括在允许表达抗体的条件下培养所述宿主细胞。

[0021] 在另一个方面中,本申请提供了用于抑制受试者血液中ApoC3活性的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。在另一个方面中,本申请提供了用于降低受试者血液中甘油三酯水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。在另一个方面中,本申请提供了用于抑制受试者的餐后脂血症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。在另一个方面中,本申请提供了用于治疗受试者的高甘油三酯血症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。在另一个方面中,本申请提供了用于治疗受试者的乳糜微粒血症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。

[0022] 在另一个方面中,本申请提供了用于降低患有高甘油三酯血症的受试者的心血管疾病风险的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。在某些实施方式中,心血管疾病是心肌梗塞。在某些实施方式中,心血管疾病是心绞痛。在某些实施方式中,心血管疾病是中风。在某些实施方式中,心血管疾病是动脉粥样硬化。

[0023] 在某些实施方式中,所述抗体降低受试者血液中乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平。

[0024] 在某些实施方式中,受试者正接受另外的降脂剂。在某些实施方式中,另外的降脂剂是HMG-CoA还原酶抑制剂。在某些实施方式中,HMG-CoA还原酶抑制剂是阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀或辛伐他汀。在某些实施方式中,另外的降脂剂是PCSK9抑制剂。在某些实施方式中,PCSK9抑制剂是阿利库单抗(alirocumab)、依伏库单抗(evolocumab)或bococizumab。在某些实施方式中,另外的降脂剂是依泽替米贝。在某些实施方式中,另外的降脂剂是依泽替米贝和HMG-CoA还原酶抑制剂的组合。在某些实施方式中,另外的降脂剂是依泽替米贝、HMG-CoA还原酶抑制剂和PCSK9抑制剂的组合。

附图说明

[0025] 图1是显示ApoC3抗体对ApoC3与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)结合的干扰的图。将ELISA微孔板用DMPC涂覆,并与混合有测试抗ApoC3抗体的ApoC3一起温育。按照ELISA比色测定的标准步骤,用生物素化的抗ApoC3多克隆山羊抗体测量保持附着于板的ApoC3的

量。

[0026] 图2是显示在抗ApoC3抗体的存在下ApoC3与VLDL结合的一组图。在A和B部分中,将VLDL固定在用于表面等离子体共振 (SPR) 测定的表面上。单独的ApoC3 (“ApoC3”), 单独的14C7 (“14C7”), 或ApoC3和14C7 (“14C7+”) (A部分); 或单独的ApoC3 (“ApoC3”), 单独的5E5 (“5E5”), 单独的6A6 (“6A6”), ApoC3和5E5 (“5E5+”), 或ApoC3和6A6 (“6A6+”) (B部分) 是在 $t=1800s$ 时注射, 且在 $t=2100s$ 注射缓冲液以除去未结合的分子。在C部分中, 在BiacoreL1芯片上捕获脂质体, 在 $t=1800s$ 时注射ApoC3, 并且在 $t=4400s$ 时注射5E5和6A6。测量SPR信号。

[0027] 图3是显示14C7和13G7减弱ApoC3抑制脂蛋白脂肪酶 (LPL) 活性的能力的图。将14C7, 13G7, 5E5或6A6抗体与Intralipid和纯化ApoC3蛋白一起温育。测量非酯化脂肪酸 (NEFA) 的产生, 并绘制与存在ApoC3但无抗ApoC3抗体时的NEFA产生相比产生的NEFA的百分比。

[0028] 图4是一组图, 其显示某些抗ApoC3抗体减弱ApoC3抑制HepG2细胞摄取极低密度脂蛋白 (VLDL) 的能力 (A部分), 并且某些抗ApoC3抗体未减弱该能力 (B部分)。将HepG2细胞与DiI VLDL和单独或在所示抗ApoC3抗体的存在下的纯化ApoC3一起温育。“莫维珠单抗”是指具有莫维珠单抗但未添加抗ApoC3抗体的阴性对照组。通过DiI染料的荧光光谱测量由HepG2细胞摄取的DiI VLDL。

[0029] 图5是显示14C7 (A部分), 5A7 (B部分), 5E5 (C部分) 和6A6 (D部分) 与人ApoC3 (huApoC3) 或食蟹猴ApoC3 (cynoApoC3) 结合的一组图。

[0030] 图6是显示5E5 (A部分), 6A6 (B部分) 和14C7 (C部分) 的表位绘图 (epitope mapping) 的一组图。合成了一系列具有7, 10或13个氨基酸的环状ApoC3肽。测量所示抗-ApoC3抗体与肽的结合, 并根据结合亲和力产生强度图。识别并强调了有助于抗体结合的氨基酸。

[0031] 图7是显示5E5 (A部分), 6A6 (B部分) 和14C7 (C部分) 的表位置换扫描 (epitope substitution scanning) 的一组图。在A和B部分中, 合成了一系列具有13个氨基酸DKFSEFWDLDP EV (SEQ ID NO:44) 的ApoC3肽, 其具有用其他19种L-氨基酸替换每个氨基酸的单个氨基酸突变。测量了所示抗ApoC3抗体与肽的结合。从结合亲和力数据产生描述野生型和突变型ApoC3肽的相对结合亲和力的置换矩阵。在C部分中, 合成了一系列具有13个氨基酸ARGWVTDGFSSLK (SEQ ID NO:45) 的ApoC3肽, 其具有用其他19种L-氨基酸替换每个氨基酸的单个氨基酸突变。测量14C7抗ApoC3抗体与肽的结合。从结合亲和力数据产生描绘野生型和突变型ApoC3肽的相对结合亲和力的置换矩阵。在A、B和C部分中的每一个中, 第一列表示从下到上的野生型ApoC3肽的序列 (SEQ ID NO:185或186)。如第一列中所示的每个位置的氨基酸置换以从较高 (左) 至较低 (右) 的结合亲和力的顺序放置。对于从左到右的每一行, 阴影强度降低到最低点, 然后增加。在最低点的左侧, 阴影强度与结合亲和力正相关; 在最低点的右侧, 阴影强度与结合亲和力负相关。

[0032] 图8是证明huApoC3过表达对AAV8-huApoC3小鼠模型中的循环餐后甘油三酯的影响的一组图。用载体 (“未处理”) 或 3×10^{11} 个AAV8-huApoC3病毒颗粒 (“+AAVC3第14天”) 感染小鼠。橄榄油攻击后血清甘油三酯水平在AAV8-huApoC3小鼠中更高 (A部分)。甘油三酯水平的曲线下面积 (AUC) 增加了38%, p 值为0.0047, 采用未配对T检验 (B部分)。

[0033] 图9是显示5E5的餐后甘油三酯降低作用的一组图。将载体或5E5抗体施用至接受 3×10^{11} 个AAV8-huApoC3病毒颗粒的小鼠。给予口服剂量的橄榄油,并在时间进程中测量甘油三酯水平(A部分)。与载体对照相比,5E5施用使曲线下面积(“AUC”)降低约25%,p值为0.030(B部分)。还在时间进程中测量血清ApoC3水平(C部分)和5E5抗体水平(D部分)。在E部分中,使用抗鸡卵溶酶体人IgG1抗体(“HyHEL5”)作为同种型对照。

[0034] 图10是显示在向表达人ApoC3的小鼠皮下注射5E5和6A6抗体后ApoC3和ApoB从血液清除加速的一系列图。抗鸡卵溶酶体人IgG1抗体(HyHEL5)用作5E5的同种型对照,且PBS用作6A6的载体对照。C部分显示血浆中人ApoC3的浓度。将A、B部分绘制为与阴性同种型对照的百分比差异,并将D部分绘制为相对于从施用抗体之前立即收集的血液样品测量的相应基线水平的百分比变化。

具体实施方式

[0035] 本公开提供了特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)并抑制ApoC3功能的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物,编码这些抗体的核酸,用于制备这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体可以减弱ApoC3抑制肝细胞摄取TRL的能力。因此,所公开的抗ApoC3抗体可用于治疗和预防高甘油三酯血症和相关疾病(例如心血管疾病和胰腺炎)。

[0036] 本文公开了若干不同类型的抗ApoC3抗体,每种抗体与ApoC3的不同的新表位结合并具有不同的功能特性。例如,在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体结合SEQ ID NO:3[FSEFWDLDP]所示的氨基酸序列内的表位,并且能够结合脂质结合的ApoC3。或者,在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体结合SEQ ID NO:2[GWTDGFSSSLK]所示的氨基酸序列内的表位,并抑制ApoC3与脂质的结合。

[0037] 1. 定义

[0038] 如本文所用,术语“ApoC3”是指载脂蛋白C3蛋白。在某些实施方式中,ApoC3是人ApoC3。示例性的人ApoC3氨基酸序列在RefSeq登录号NP_000031.1中示出。NP_000031.1的成熟氨基酸序列如下:

[0039] SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFSSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLDP EVRPTSAVAA (SEQ ID NO:1)。

[0040] 如本文所用,术语“抗体”包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段、以及包含抗体CDR、VH区或VL区的分子。抗体的实例包括单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异源偶联抗体、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv(scFv)、scFv-Fc、骆驼抗体(例如,美洲驼抗体)、骆驼化抗体、亲合体(affybody)、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如抗抗Id抗体)、和上述中任一种的抗原结合片段。在某些实施方式中,本文描述的抗体是指多克隆抗体群。抗体可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁或IgA₂)、或任何亚类(例如IgG_{2a}或IgG_{2b})的免疫球蛋白分子。在某些实施方式中,本文描述的抗体是IgG抗体,或其类别(例如,人IgG₁或IgG₄)或亚类。在

一个具体实施方式中,抗体是人源化单克隆抗体。

[0041] 如本文所用,术语“分离的抗体”是指已经从其天然环境的至少一种组分鉴定和分离和/或回收的抗体。术语“分离的抗体”包括重组宿主细胞内的原位抗体。

[0042] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”是指见于重链和轻链多肽两者的可变区内的非连续抗原结合位点。这些特定区域已由Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616 (1977)和Kabat等,Sequences of protein of immunological interest.(1991),Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987),和MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)所描述,所有这些文献均通过引用整体并入本文,其中定义包括当彼此比较时氨基酸残基的重叠或子集。在某些实施方式中,术语“CDR”是如Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616 (1977)和Kabat等,Sequences of protein of immunological interest.(1991)所定义的CDR。CDRH1、CDRH2和CDRH3表示重链CDR,CDRL1、CDRL2和CDRL3表示轻链CDR。

[0043] 如本文所用,术语“框架(FR)氨基酸残基”是指免疫球蛋白链的框架区中的那些氨基酸。如本文所用的术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的一部分但不是CDR(例如,使用CDR的Kabat定义)的一部分的氨基酸残基。

[0044] 如本文所用,术语“可变区”和“可变结构域”可互换使用,并且在本领域中是常见的。可变区通常是指抗体的一部分,通常是轻链或重链的一部分,通常为成熟重链中氨基末端110至120个氨基酸或110至125个氨基酸,并且为成熟轻链中约90至115个氨基酸,其在抗体之间在序列上有很大差异,并且用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。序列的可变性集中在称为互补决定区(CDR)的那些区域中,而可变域中更高度保守的区域称为框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,据信轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施方式中,可变区是人可变区。在某些实施方式中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在特定实施方式中,可变区是灵长类动物(例如,非人灵长类动物)可变区。在某些实施方式中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和灵长类动物(例如,非人灵长类动物)框架区(FR)。

[0045] 术语“VL”和“VL结构域”可互换使用以指抗体的轻链可变区。

[0046] 术语“VH”和“VH结构域”可互换使用以指抗体的重链可变区。

[0047] 如本文所用,术语“恒定区”和“恒定域”是可互换的,并且在本领域中是常见的。恒定区是抗体部分,例如轻链或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合,但可以表现出各种效应功能,例如与Fc受体的相互作用。免疫球蛋白分子的恒定区通常具有相对于免疫球蛋白可变域更保守的氨基酸序列。

[0048] 如本文所用,基于恒定域的氨基酸序列,术语“重链”当用于提及抗体时可以指任何不同类型,例如alpha(α),delta(δ),epsilon(ϵ),gamma(γ)和mu(μ),其分别产生IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类抗体,包括IgG的亚类,例如IgG₁,IgG₂,IgG₃和IgG₄。

[0049] 如本文所用,基于恒定域的氨基酸序列,术语“轻链”当用于提及抗体时可以指任何不同类型,例如kappa(κ)或lambda(λ)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。在具体的实施方式中,轻链是人轻链。

[0050] 如本文所用,术语“特异性结合”是指抗体以小于约 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M或更小的解离常数(Kd)与抗原结合,或以比其对非特异性抗原的亲和力大至少两倍的亲和力与抗原结合的能力。

[0051] 如本文所用,“表位”是指抗体可以特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是例如多肽的连续氨基酸(线性或连续表位),或者表位可以例如由一个或多个多肽的两个或更多个非连续区域形成(构象、非线性、不连续或非连续表位)。在某些实施方式中,抗体结合的表位可以通过例如NMR光谱、X射线衍射晶体学研究、ELISA测定、氢/氘交换与质谱联用(例如,液相色谱电喷雾质谱法)、肽扫描测定或诱变作图(例如,定点诱变作图)来确定。

[0052] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指本文描述的治疗性或预防性措施。“治疗”方法使用向患有疾病或病症,或倾向于患有这样的疾病或病症的受试者施用抗ApoC3抗体,以预防、治愈、延迟疾病或病症或复发性疾病或病症、降低其严重性,降低其发生风险,或改善其一种或多种症状,或者使受试者的存活延长超出在没有这样的治疗的情况下所预期的存活。

[0053] 如本文所用,在向受试者施用治疗的背景下,术语“有效量”是指实现期望的预防或治疗效果的治疗的量。

[0054] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。

[0055] 如本文所用,术语“或”表示和/或。

[0056] 如本文所用,术语“约”和“大约”,当用于修饰数值或数值范围时,表示该值或范围的5%至10%以上和5%至10%以下的偏差仍然在所记载的值或范围的预期含义内。

[0057] 2. 抗ApoC3抗体

[0058] 本公开提供了特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)并抑制ApoC3功能的抗体(例如,分离的抗体)。

[0059] 在某些实施方式中,抗ApoC3抗体结合哺乳动物的ApoC3蛋白。在某些实施方式中,抗ApoC3抗体结合人ApoC3。在某些实施方式中,抗ApoC3抗体结合食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*) (食蟹猴) ApoC3。在某些实施方式中,抗ApoC3抗体结合鼠ApoC3。

[0060] 在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体减弱ApoC3抑制肝细胞摄取TRL(例如VLDL)或TRL残余物的能力(体内或体外)。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体使ApoC3抑制肝细胞摄取TRL(例如,VLDL)或TRL残余物的能力减弱至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体使ApoC3抑制肝细胞摄取TRL(例如,VLDL)或TRL残余物的能力减弱至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。

[0061] 在某些实施方式中,当在餐前、餐中或餐后施用于受试者时,本文公开的抗体能够抑制受试者的餐后脂血症。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体能够抑制受试者的餐后脂血症至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体能够抑制受试者的餐后脂血症至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。

[0062] 在某些实施方式中,当在餐前、餐中或餐后施用于受试者时,本文公开的抗体能够降低受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体能够使受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平降低至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体能够使受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平降低至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。

[0063] 在某些实施方式中,本文公开的分离的抗体能够增加ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)从受试者血液清除的速率。在某些实施方式中,抗ApoC3抗体能够使ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)从受试者血液清除的速率增加至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%,或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体能够使ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)从受试者血液清除的速率增加至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。评估ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)的清除的方法包括但不限于同位素示踪物技术,其中所述同位素可以是放射性的或稳定的。

[0064] 在某些实施方式中,本文公开的分离的抗体能够降低受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)的水平。在某些实施方式中,抗ApoC3抗体能够使受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)的水平降低至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体能够使受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)的水平降低至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)水平的降低维持至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,18,24,30,36,42或48小时。

[0065] 在某些实施方式中,本文公开的抗体减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)脂解的能力。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体使ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)脂解的能力减弱至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体使ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)脂解的能力减弱至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或

通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体在1,2,3,4或5 μ M的浓度下使ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)脂解的能力减弱至少50%。

[0066] 在某些实施方式中,本文公开的抗体抑制ApoC3与脂质或脂蛋白的结合。在某些实施方式中,脂质包含脂肪酸链。在某些实施方式中,脂质包含磷脂酰基。在某些实施方式中,脂质包含磷脂酰胆碱(例如DMPC)、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇或磷脂酰甘油。在某些实施方式中,脂质是甘油三酯。在某些实施方式中,脂蛋白是TRL(例如,VLDL)或TRL残余物。在某些实施方式中,所公开的抗ApoC3抗体抑制ApoC3与脂质和脂蛋白(例如,甘油三酯、TRL(例如,VLDL)或TRL残余物)的结合至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体使ApoC3与脂质和脂蛋白(例如,甘油三酯、TRL(例如,VLDL)或TRL残余物)的结合减弱至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。

[0067] 在某些实施方式中,本文公开的抗体能够结合脂质结合的ApoC3(例如,与甘油三酯、TRL(例如,VLDL)或TRL残余物结合的ApoC3),如通过本文所述的方法(例如在实施例3中)或通过本领域技术人员已知的方法所评估。

[0068] 本文公开的抗体可具有前述实施方式中所述的一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、或所有特征。例如,在某些实施方式中,本文公开的抗体在1,2,3,4或5 μ M的浓度下减弱ApoC3抑制肝细胞摄取TRL(例如,VLDL)或TRL残余物的能力至少约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%或99%,并且减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)或TRL残余物的脂解的能力至少50%。在某些实施方式中,本文公开的抗体减弱ApoC3抑制TRL(例如,VLDL)或TRL残余物的肝细胞摄取的能力至少约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%活99%,并且能够结合脂质结合的ApoC3(例如,与甘油三酯、TRL(例如,VLDL)或TRL残余物结合的ApoC3)。

[0069] 可以使用任何合适的测定来测量本文公开的抗体的前述功能活性。示例性的测定包括但不限于本文实施例中公开的功能测定。

[0070] 示例性抗ApoC3抗体的氨基酸序列列于本文的表1-4中。

[0071] 表1. 示例性抗ApoC3抗体的重链CDR氨基酸序列。

[0072]

VH 克隆	CDRH1	SEQ ID NO:	CDRH2	SEQ ID NO:	CDRH3	SEQ ID NO:
5A11	TRYA	4	VIAYDGGSTYYSPSLKS	5	VRLIEAPYEYDY	6
5E5	TYSMR	7	SISTDGGGTAYRDSVK	8	AGYSD	9
6A6	SYAGR	10	SINAGGGSTSYADSVK	11	NSYRY	12
8F4	SYSMY	13	AIKTDGGSTNYADSVK G	14	QGYGT	15
11H1	SYSMR	16	SIKSDGSITSYADSVK	17	QGYIN	18
5A4	HYTMY	19	AISGGGDRTIYTDSVK	20	QGYEY	21
5A7	NRRYA	22	VIVYDGNTHVSPSLRS	23	VLLLRDPLSLDY	24
8A4	NYAMR	25	SIDSGGDRTKYGDSVK	26	QGYIF	27
8B4	NAYLY	28	GINPAGDGRAYATSVK G	29	ASRVVAYDS	30
8H4	SYSMR	16	SINSDGGSTKYSDSVK	31	QGYTD	32
10B6	SYAMR	33	SINIDGGSTRYTDSVQ	34	QGYIY	35
12A3	NYAMR	25	SINIAGSSVYADSVK	36	QGFVY	37
12C3	SYSMF	38	GINGGGDRSNYADSVR D	39	QGYAY	40
12C1 2	TSYYAW T	41	AIVYDGGSTFYSPSLKS	42	SYGLGLYDL	43
12D1	TYSMR	7	SISTDGGGTAYRDSVK	8	AGYSD	9
12D4	SSNMR	47	TISPDGGKTLYADSVK	48	AGYDY	49
12E12	NIYMS	50	AINTAGTVTYADSVK	51	GEVD	52

[0073]

			G			
13C7	RYYMS	53	SIYKDGSNTYYADSVK	54	ALRAEYDY	55
13G7	TTAPAW G	56	VIAFDGSAYYSPSLKS	57	LGGRNYPPYVEL	58
14C4	NYDMS	59	VINSDGDGTYYVDSVK G	60	ANLGL	61
14C7	TNSYYW S	62	AIDYSGDTYYSPSLKS	63	RIPTGEY	64
14G4	RYTMN	65	AISPDGGKTIDADSVK	66	GHNMDY	67
12D7	DYAMS	68	AITSNKGKRTDYAESMK	69	GPPHYIIPSMTPRD S	70
12G8	DYAMS	68	AIRWNGDTYYAESMK	71	HRPGGALDT	72

[0074] 表2. 示例性抗ApoC3抗体的轻链CDR氨基酸序列。

[0075]

VL 克隆	CDRL1	SEQ ID NO:	CDRL2	SEQ ID NO:	CDRL3	SEQ ID NO:
5A11	GLSSGSVTTRSYPG	73	STSSRHS	74	ALDIGSYIV	75
5E5	KTSQGLVHSDGKTYFY	76	QVSNRAS	77	AQGTYYPHT	78
6A6	KASQSLIHTDGKTYLY	79	QVSSHES	80	AQATYNPRT	81
8F4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNRGS	83	AQATYYGHS	84
11H1	RASQSLIHSAGKTYFY	85	QVSNRES	86	AQGTYNPKT	87
5A4	KAIQSLVHTDGKTYLY	88	QVSNRGS	83	AQGTYSST	89
5A7	AGTSSDIGAYNFVS	90	DIDKRAS	91	AAYGSRDN VV	92
8A4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNHES	93	AQATYYPLT	94
8B4	KSSQSVESGSDQKSYLN	95	YASTQES	96	QQAYSAPFT	97
8H4	KVSQSLVHSDGKTYLY	98	QVSNRDS	99	AQGTYNPYT	100
10B6	KASQSLVHSNGVIYFY	101	QVSNRDS	99	AQGTYYPHS	102
12A3	KAGRSLVHSDGRTYLY	103	QVSNRSS	104	AQGTYYPVT	105
12C3	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QTSNRGS	106	AQATYSPHT	107
12C12	TGSSSNIGDNYVN	108	SNSNRAS	109	SSWDDSLSG VV	110
12D1	KTSQSLTHSDGKTYLY	111	QVSNRGS	83	AQATYYPHT	113
12D4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNQGS	114	AQATYAPHS	115
12E12	GLSSGSVTSVTYPG	116	NTNSRFS	117	SVYIGGGIYP AV	118
13C7	AGTSSDIGGYNYVA	119	EVNKRAS	120	ASYRSSNSY V	121
13G7	QGGSLRVSYAH	122	DDDSRPS	123	QSADSSGDN WV	124
14C4	KATQSLVHSDGKTYLS	125	QVSNRGS	83	AQAPYWT	126
14C7	GLNSGSVTSSNYPD	127	NTNSRHS	128	ALYMGSDSV V	129
14G4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNQGS	114	AQATYTPRT	130

[0076]

12D7	QGGTLGRYYGS	131	GDNSRPS	132	ESFDFSGNA AV	133
12G8	QGGNFGNFYAS	134	KDSERPS	135	QSGSSSDNV V	136

[0077] 表3. 示例性抗ApoC3抗体的VH氨基酸序列。

[0078]

VH 克隆	氨基酸序列	SEQ ID NO
5A11	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSITTRYAWSWIRQPP GKGLEWMGVIAVDGSTYYSPSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLTS VTPEDTAVYYCARVRLIEAPYEYDYWGQGTQVTVSS	137
5E5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMN NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	138
6A6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAGRWVRQVPG KGLEWVSSINAGGGSTSYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMN SLKPEDTAKYYCTQNSYRYWGQGTQVTVSS	139
8F4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYSMYWVRQAP GKGLERVAAIKTDGGSTNYADSVKGRFTVSRDNANTLYLQ MNSLKSEDTAVYYCVIQGYGTWGQGTQVTVSS	140
11H1	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMRWVRQAPG KGLEWLSSIKSDGSITSYADSVKGRFTMSRDNANTLYLQMN SLKSEDTAMYYCTNQGYINWGQGTQVTVSS	141
5A4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFAFSHYTMYWVRQAP VRGLERVSAISGGGDRITTYTDSVKGRFTISRDNANALYLQMN NSLQPEDTAVYYCVAQGYEYWGQGTQVTVSS	142
5A7	EVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGASITNRRYAWTWIRQPP GKGLEWMGVIVYDGNTHVSPSLRSRTSISRDTSKNQFSLQLSS LTPEDTAVYYCARVLLLRDPLSLDYWGQGTQVTVSS	143
8A4	QVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCTASGFTFNMYAMRWVRQAE GKGLEWVSSIDSGGDRTKYGDYSVKGRFISRDNANTLYLQ MDALKPEDTGYYCVSQQGYIFWGQGAQVTVSS	144
8B4	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAYLYWVRQVPG KGLEWVSGINPAGDGRAYATSVKGRFTISRDNANTLYLQMN NTLESDDTAVYYCATASRVVAYDSWGQGTQVTVSS	145
8H4	ELQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYSMRWVRQTPG KGLEWVTSINSDGGSTKYSDSVKGRFTISRDNANTLYLQMN NVKPEDTAIYYCAIQGYTDWGQGTQVTVSS	146
10B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMRWVRQAP GKGLEWISSINIDGGSTRYTDSVQGRFTVSRDNANTLYLQMN NNLKPEDTGIYYCTIQGYIYWGQGTQVTVSS	147
12A3	ELQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFTFSNYAMRWVRQAP GGRLEWVSSINIAGSSVYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMN NSLKSEDTAVYYCAMQGFVYWGQGTQVTVSS	148
12C3	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMFWRQSPG KGLERVSGINGGGDRSNYADSVRDRFTISRDNANTLYLQMN SLKSEDTAVYYCVIQGYAYWGQGTQVTVSS	149

[0079]

12C12	EVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTSYYAWTWIRQPP GKGLEWVGAIYVDGSTFYSPSLKSRTSISRDTSKSQFSLQLSSV TPEDTAVYYCARSYGLGLYDLWGQGTQVTVSS	150
12D1	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	138
12D4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSSNMRWVRQVS GKGLEWVSTISPDGGKTLYADSVKGRFTISRDNANTLHLQM VSLKPEDTALYYCVKAGYDYWGQGTQVTVSS	152
12E12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRVSCAASGLTFSNIYMSWVRQAPG KGLEWVSAINTAGTVTYADSVKGRFTISRDNANTLYLQM NSLKPEDTAHYCTTGEVDWGKGLTVTVSS	153
13C7	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYSWVRQAP GKGLEWVSSIYKDGSNTYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLKSEDTAVYYCAKALRAEYDYWGQGTQVTVSS	154
13G7	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISTTAPAWGWIRQSP GKGLDWMVIAFDGSAYYSPSLKSRTLISRDTSKNQFSLQLSS VTPEDTAVYYCARLGGRNYPYVELWGQGLTVTVSS	155
14C4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGNYDMSWVRQAP GKGPEWVSVINSDDGTYYVDSVKGRFTISRDNANTLYLQ MNSLKPEDRAVYYCAIANLGLWGQGLTVTVSS	156
14C7	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTSYYWSWIRQPP GKGLEWMGAIDYSGDTYYSPSLKSRTSISRDTSKNQFTLQLTS VTPEDTAVYYCVSRIPTGEYWGQGTQVTVSS	157
14G4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSRYSMTNWVRQAP GKGLEWLSAISPDGGKTIDADSVKGAFASSRDNTMNTLYLD MNSLKPEDAAVYYCVAGHNMDYWGKGLTVTVSS	158
12D7	ELQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAP GKGLEWVSAITSNGKRTDYAESMKGRFTISRDNANTLYLEM NSLKSEDTAVYYCTKGPPHYIPIPSMTPRDSWGQGTQVTVSS	159
12G8	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIRWNGDTYYAESMKGRFDMSRDNAKNTLYLQ MNSLKSEDTAVYYCAKHRPGGALDTWGQGLTVTVSS	160

[0080] 表4. 示例性抗ApoC3抗体的VL氨基酸序列。

[0081]

VL 克隆	氨基酸序列	SEQ ID NO
5A11	QAVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTTRSYPGWFAQTP GQAPRSLIHSTSSRHSGIPTRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEA DYCYCALDIGSYIVFGGGTHLTVL	161
5E5	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKA EDAGVYYCAQGTYYPHTFGSGTRLEIK	162
6A6	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCKASQSLIHTDGKTYLYWLLQ KPGQRPQLLIYQVSSHESGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAE DAGVYYCAQATYNPRTFGQGKLEIK	163

[0082]

8F4	DLVLTQIPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLLQ KPGQSPQRLLIYQVSNRSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVEAE DAGVYYCAQATYYGHSFGSGTRLEIK	164
11H1	ATMLTQSPGSLTIVPGESASISCRASQSLIHSAGKTYFYWLLQK PGQRPQLLIYQVSNRESGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAED AGVYYCAQGTYNPKTFGQGTKLEIK	165
5A4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKAIQSLVHTDGKTYLYWFLQ KPGQSPQRLLIYQVSNRSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAE DAGVYYCAQGTYSKTFGQGTKLEIK	166
5A7	SSALTQPPSMSGTLGKTLTISCAGTSSDIGAYNFVSWYQQLP TAPKLLIYDIDKRASGIPDRFSGSGSGNTASLSISGLQSEDEAD YYCAAYGSRDNVVFGGGTHLTVL	167
8A4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLL QKPGQRPQLLIYQVSNHESGVPDRFTGSGSGTDYTLKISGVKA EDAGVYYCAQATYYPLTFGQGTKVELK	168
8B4	EIVLTQSPSSVTASVGEKVTINCKSSQSVESGSDQKSYLNWYQ QRPQSPRLLIYASTQESGIPDRFSGSGSTTDFTLTISSVQPED AAVYYCQQAYSAPFTFGQGTKVELK	169
8H4	DVVLTQTPGSLSVVPGESASISCKVSQSLVHSDGKTYLYWLL QKPGQSPQRLLIYQVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKA EDAGVYYCAQGTYNPYTFGSGTRLEIK	170
10B6	ATMLTQSPGSLSIVPGESASISCKASQSLVHSNGVIYFYWLLQ KPGQSPQRLLIYQVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAE DAGVYYCAQGTYYPHSFGSGTRLQIK	171
12A3	DVVLTQTPGSLSVVPGESANISCKAGRSLVHSDGRTYLYWLL QKPGQSPQRLLIYQVSNRSSGVPDRFTGSGSGTDFTLKITGVKA EDAGVYYCAQGTYYPVTFGQGTKVELK	172
12C3	DVVLTQTPASLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLL QKPGQSPQRLLIYQTSNRSGVPDRFTGSGSGTDFTLDISGVKA EDAGVYYCAQATYSPHTFGSGTRLEIK	173
12C12	QAVLTQPPSVSGSPGQKFTISCTGSSSNIGDNYVNWYQHLP GTPKLLIYSNSNRASGVPDRFSGSGSGSSASLTITGLQAEDEAD YYCSSLWDDSLSGVVFGGGTHLTVL	174
12D1	SALDVVLTQTPGSLSVVPGESASISCKTSQSLTHSDGKTYLYW LLQKPGQSPQRLLIYQVSNRSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGV KAEDAGMYCAQATYYPHTFGSGSRLEIER	175
12D4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLL QKPGQSPQRLLIYQVSNQSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKA EDAGVYYCAQATYAPHSFGSGTRLEIK	176
12E12	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSVTYPGWYQQKP GQAPRTLIYNTNSRFSGVPNRFSGSISGNKAALTITGALPEDEA DYYCSVYIGGGIYPAVFGGGTHLTVL	177
13C7	NFMLTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDIGGYNVVAWYQQLP GTAPKLLISEVNKRASGIPDRFSGSGSGNTASLSISGLQSEDEA DYYCASYRSSNSYVFGGGTKLTVL	178
13G7	QPVLTQPPALSVTLGQTAKITCQGGSLRVSYAHWYQQKPGQ APVLVSYYDDSDRPSGIPERFSGSGSGATATLTISGAQAEDEGD YYCQSADSSGDNWVFGGGTHLTVL	179

[0083]

14C4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKATQSLVHSDGKTYLSWLLQ KPGQSPQRLLYQVSNRGSVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAE DAGVYYCAQAPYWTFGQGKLEIK	180
14C7	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLNSGSVTSSNYPDWYQQTP GQAPRLLIYNTNSRHSGVPSRFGSGSISGNKAALTITGAQPEDEA DYCYCALYMGSDSVVFGGGTHLTVL	181
14G4	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLL QKPGQSPQRLLYQVSNQGSVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKA EDAGVYYCAQATYTPRFTFGQGTTLLEVK	182
12D7	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGTLGRYYGSWYQQKPAQA PVLLIYGDNSRPSGIPERFSGSKSGDTATLTISGTQAEDADYY CESFDFSGNAAVFGGGTHLTVL	183
12G8	QAVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGNFYASWYQQKPGQ APVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDADY YCQSGSSSDNVVFGGGTHLTVL	151

[0084] 在一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3(例如,人ApoC3)的分离的抗体,该抗体包含VH结构域,所述VH结构域包含本文表3中列出的VH结构域中的一个、两个或所有三个CDR。在某些实施方式中,抗体包含表3中列出的VH结构域之一的CDRH1。在某些实施方式中,抗体包含表3中列出的VH结构域之一的CDRH2。在某些实施方式中,抗体包含表3中列出的VH结构域之一的CDRH3。

[0085] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)的分离的抗体,该抗体包含VL结构域,所述VL结构域包含本文表4中公开的VL结构域中的一个、两个或所有三个CDR。在某些实施方式中,抗体包含表4中列出的VL结构域之一的CDRH1。在某些实施方式中,抗体包含表4中列出的VL结构域之一的CDRH2。在某些实施方式中,抗体包含表4中列出的VL结构域之一的CDRH3。

[0086] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以根据Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat等,Sequences of protein of immunological interest(1991)而测定。在某些实施方式中,根据Kabat测定抗体的轻链CDR,并根据MacCallum(同上)测定抗体的重链CDR。

[0087] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以根据Chothia编号方案确定,该方案是指免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,Chothia C&Lesk AM,(1987),J Mol Biol 196:901-917; Al-Lazikani B等,(1997)J Mol Biol 273:927-948;Chothia C等,(1992)J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A等,(1990)J Mol Biol 215(1):175-82;和美国专利号7,709,226)。通常,当使用Kabat编号惯例时,Chothia CDRH1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDRH2环存在于重链氨基酸52至56处,并且Chothia CDRH3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDRL1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDRL2环存在于轻链氨基酸50至56处,并且Chothia CDRL3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDRH1环的末端在H32和H34之间变化,这取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果既不存在35A也不存在35B,则环结束于32处;如果仅存在35A,则环结束于33处;如果同时存在35A和35B,则环结束于34处)。

[0088] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以根据如Lefranc M-P,(1999) The

Immunologist 7:132-136和Lefranc M-P等,(1999) Nucleic Acids Res27:209-212中所述的IMGT编号系统来确定。根据IMGT编号方案,CDRH1位于26至35位,CDRH2位于51至57位,CDRH3位于93至102位,CDRL1位于27至32位,CDRL2位于50至52位,CDRL3位于89至97位。

[0089] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以根据AbM编号方案确定,其是指AbM高变区,其代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折中,并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group, Inc.)所使用。

[0090] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以根据MacCallum RM等,(1996) J Mol Biol262:732-745确定。还参见例如,Martin A. Antibody Engineering中的“Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,”Kontermann和Dübel编,第31章,422-439页,Springer-Verlag, Berlin (2001)。

[0091] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含表3中列出的VH结构域的CDRH1、CDRH2和CDRH3区氨基酸序列,所述轻链可变区包含表4中列出的VL结构域的CDRL1、CDRL2和CDRL3区氨基酸序列,其中每个CDR独立地根据如本文所公开的Kabat、Chothia、IMGT、MacCallum或AbM所定义。

[0092] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如人ApoC3) 的分离的抗体,该抗体包含:

[0093] 包含SEQ ID NO:4,7,10,13,16,19,22,25,28,33,38,41,47,50,53,56,62,65或68的氨基酸序列的CDRH1;或

[0094] 包含SEQ ID NO:5,8,11,14,17,20,23,26,29,31,34,36,39,42,48,51,54,57,60,63,66,69或71的氨基酸序列的CDRH2;或

[0095] 包含SEQ ID NO:6,9,12,15,18,21,24,27,30,32,35,37,40,43,49,52,55,58,61,64,67,70或72的氨基酸序列的CDRH3;或

[0096] 包含SEQ ID NO:73,76,79,82,85,88,90,95,98,101,103,108,111,116,119,122,125,127,131或134的氨基酸序列的CDRL1;或

[0097] 包含SEQ ID NO:74,77,80,83,86,91,93,96,99,104,106,109,114,117,120,123,128,132或135的氨基酸序列的CDRL2;或

[0098] 包含SEQ ID NO:75,78,81,84,87,89,92,94,97,100,102,105,107,110,113,115,118,121,124,126,129,130,133或136的氨基酸序列的CDRL3。

[0099] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VH结构域,所述VH结构域分别包含以下所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列:SEQ ID NO:4,5和6;7,8和9;10,11和12;13,14和15;16,17和18;19,20和21;22,23和24;25,26和27;28,29和30;31,32和33;34,35和36;37,38和39;40,41和42;43,44和45;46,47和48;49,50和51;52,53和54;55,56和57;58,59和60;61,62和63;64,65和66;67,68和69;70,71和72。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VH结构域,所述VH结构域分别包含SEQ ID NO:7,8和9所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VH结构域,所述VH结构域分别包含SEQ ID NO:10,11和12所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了

特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VH结构域,所述VH结构域分别包含SEQ ID NO:62,63和64所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0100] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VL结构域,所述VL结构域分别包含以下所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:SEQ ID NO:73,74和75;76,77和78;79,80和81;82,83和84;85,86和87;88,83和89;90,91和92;82,93和94;95,96和97;98,99和100;101,99和102;103,104和105;82,106和107;108,109和110;111,83和113;82,114和115;116,117和118;119,120和121;122,123和124;125,83和126;127,128和129;82,114和130;131,132和133;或124,135和136。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VL结构域,所述VL结构域分别包含SEQ ID NO:76,77和78所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VL结构域,所述VL结构域分别包含SEQ ID NO:79,80和81所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含VL结构域,所述VL结构域分别包含SEQ ID NO:62,63和64所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0101] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区,和含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:4,5,6,73,74和75;7,8,9,76,77和78;10,11,12,79,80和81;13,14,15,82,83和84;16,17,18,85,86和87;19,20,21,88,83和89;22,23,24,90,91和92;25,26,27,82,93和94;28,29,30,95,96和97;16,31,32,98,99和100;33,34,35,101,99和102;25,36,37,103,104和105;38,39,40,82,106和107;41,42,43,108,109和110;7,8,9,111,83和113;47,48,49,82,114和115;50,51,52,116,117和118;53,54,55,119,120和121;56,57,58,122,123和124;59,60,61,125,83和126;62,63,64,127,128和129;65,66,67,82,114和130;68,69,70,131,132和133;或68,71,72,124,135和136。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区,和含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:7,8,9,76,77和78所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区,和含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:10,11,12,79,80和81所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其中所述抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区,和含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:62,63,64,127,128和129所示的氨基酸序列。

[0102] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3 (例如,人ApoC3) 的分离的抗体,其包含重链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,152,153,154,155,156,157,158,159或160所示的氨基酸序列至少75%,80%,85%,90%,95%或100% (例如,至少86,87,88,89,90,91,92,93,94,

95,96,97,98或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,152,153,154,155,156,157,158,159或160所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:138所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:139所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:157所示的氨基酸序列的重链可变区。

[0103] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3(例如,人ApoC3)的分离的抗体,其包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183或151所示的氨基酸序列至少75%,80%,85%,90%,95%或100%(例如,至少86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183或151所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:162所示的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:163所示的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:181所示的氨基酸序列的轻链。

[0104] 在另一个方面中,本公开提供了特异性结合ApoC3(例如,人ApoC3)的分离的抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,152,153,154,155,156,157,158,159或160所示的氨基酸序列至少75%,80%,85%,90%,95%或100%(例如,至少86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98或99%)相同的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183或151所示的氨基酸序列至少75%,80%,85%,90%,95%或100%(例如,至少86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98或99%)相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,152,153,154,155,156,157,158,159或160所示的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183或151所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含分别具有以下所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区:SEQ ID NO:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。在某些实施方式中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:138和163所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:139和163所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:157和181所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

[0105] 在另一个方面中,本公开提供了分离的抗体,其与本文所述的抗体结合相同或重叠的ApoC3表位(例如,人ApoC3的表位),例如,分别包含以下所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体:SEQ ID NO:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,

143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。抗体的表位可以通过例如NMR光谱、表面等离子体共振(BIAcore®)、X射线衍射晶体学研究、ELISA测定、氢/氘交换联用质谱(例如,液相色谱电喷雾质谱)、肽扫描测定或诱变作图(例如,定点诱变作图)来确定。

[0106] 在另一个方面中,本公开提供了分离的抗体,其与分别包含以下所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争结合ApoC3(例如,人ApoC3):SEQ ID NO:137和161,138和162,139和163,140和164,141和165,142和166,143和167,144和168,145和169,146和170,147和171,148和172,149和173,150和174,138和175,152和176,153和177,154和178,155和179,156和180,157和181,158和182,159和183,或160和151。竞争性结合可以在其中在测试下的免疫球蛋白抑制参照抗体与共同抗原(例如ApoC3(例如人ApoC3))的特异性结合的测定中确定。已知许多类型的竞争性结合测定,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见Stahli C等,(1983)Methods Enzymol 9:242-253);固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland TN等,(1986)J Immunol 137:3614-9);固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow E&Lane D,(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel GA等,(1988)Mol Immunol 25(1):7-15);固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung RC等,(1990)Virology 176:546-52);和直接标记的RIA(Moldenhauer G等,(1990)Scand J Immunol 32:77-82)。通常,这样的测定包括使用与固体表面结合的纯化的ApoC3(例如人ApoC3)或带有未标记的测试免疫球蛋白和标记的参照免疫球蛋白任一者的细胞。竞争性抑制可以通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争抗体过量存在时,它将抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合至少50-55%,55-60%,60-65%,65-70%,70-75%或者更多。可以使用标记的抗原或标记的抗体以大量不同的形式配置竞争结合测定。在该测定的常见形式中,将抗原固定在96孔板上。然后使用放射性或酶标记测量未标记的抗体阻断标记的抗体与抗原结合的能力。进一步的细节参见,例如,Wagener C等,(1983)J Immunol 130:2308-2315;Wagener C等,(1984)J Immunol Methods 68:269-274;Kuroki M等,(1990)Cancer Res 50:4872-4879;Kuroki M等,(1992)Immunol Invest 21:523-538;Kuroki M等,(1992)Hybridoma 11:391-407和Antibodies:A Laboratory Manual,Ed Harlow E&Lane D编辑,同上,pp.386-389。

[0107] 在某些实施方式中,本公开提供了分离的抗体,其结合氨基酸序列FSEFWDLDP E (SEQ ID NO:3)内的ApoC3的表位。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3内的至少一个氨基酸,并且任选地包含来自与SEQ ID NO:3邻接的SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸。在某些实施方式中,表位至少包含SEQ ID NO:3的2,5,6,8或10位的至少一个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的2,5,6,8或10位的至少两个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的2,5,6,8或10位的至少三个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的2,5,6,8或10位的至少四个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的5和6位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的2,5和6位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的2,5和8位的氨基酸。在某些实施方式中,表位

包含SEQ ID NO:3的2,5,6和8位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的10位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的6和10位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的8和10位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的6和8位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:3的6,8和10位的氨基酸。在某些实施方式中,本公开提供了分离的抗体,其与分别包含SEQ ID NO:138和162;或139和163所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争结合ApoC3 (例如人ApoC3)。在某些实施方式中,抗体包含具有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,和具有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含以下所示的氨基酸序列:SEQ ID NO:7,8,9,76,77和78;或10,11,12,79,80和81。在某些实施方式中,重链可变区和轻链可变区分别包含SEQ ID NO:138和162;或139和163所示的氨基酸序列。这样的抗体任选地还具有一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、或全部以下特征:(a) 抗体能够结合脂质结合的ApoC3 (例如,与甘油三酯、TRL (例如,VLDL) 或TRL残余物结合的ApoC3); (b) 抗体不能减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL (例如VLDL) 脂解的能力 (例如,抗体在1,2,3,4,5,6,7,8,9或10 μ M的浓度下使ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL (例如,VLDL) 脂解的能力减弱小于50%); (c) 抗体能够使ApoC3抑制肝细胞摄取TRL (例如VLDL) 或TRL残余物的能力减弱至少约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%或99%; (d) 当在餐前、餐中或餐后施用至受试者时,抗体能够抑制受试者的餐后脂血症 (例如,抑制受试者血清中餐后甘油三酯的水平增加至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%或80%); (e) 当在餐前、餐中或餐后施用至受试者时,抗体能够降低受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平; (f) 抗体能够增加ApoC3和/或ApoB从受试者血液清除的速率; (g) 抗体能够降低受试者血液中ApoC3的水平至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%或80%;和(h) 抗体能够降低受试者血液中的ApoB水平至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%或80%,其中所述特征通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法评估。

[0108] 在某些实施方式中,本公开提供了分离的抗体,其结合氨基酸序列GWVTDGFSSLK (SEQ ID NO:2) 内的ApoC3的表位。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2内的至少一个氨基酸,并且任选地包含来自与SEQ ID NO:2邻接的SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7,9或10位的至少一个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7,9或10位的至少两个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7,9或10位的至少三个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7,9或10位的至少四个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7,9或10位的至少五个氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的4和9位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的4,6和9位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4和6位的氨基酸。在一些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6和9位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7和9位的氨基酸。在某些实施方式中,表位包含SEQ ID NO:2的1,4,6,7,9和10位的氨基酸。在某些实施方式中,本公开提供了分离的抗体,其与分别包含SEQ ID NO:157和181所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争结合ApoC3 (例如人ApoC3)。在某些实施方式中,抗体包含具有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,和具有互补决定区CDRL1、

CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:62,63,64,127,128和129所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区和轻链可变区分别包含SEQ ID NO:157和181所示的氨基酸序列。这样的抗体任选地还具有一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、或全部以下特征:(a)抗体在1,2,3,4或5 μ M的浓度下能够使ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)脂解的能力减弱至少50%;(b)抗体能够抑制ApoC3与脂质和脂蛋白(例如甘油三酯、TRL(例如VLDL)或TRL残余物)的结合至少70%,80%,90%,95%,96%,97%,98%或99%;(c)抗体能够使ApoC3抑制肝细胞摄取TRL(例如VLDL)或TRL残余物的能力减弱至少约10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%或99%;(d)当在餐前、餐中或餐后施用至受试者时,抗体能够抑制受试者的餐后脂血症;(e)当在餐前、餐中或餐后施用至受试者时,抗体能够降低受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平;(f)抗体能够增加ApoC3和/或ApoB从受试者血液清除的速率;和(g)抗体能够降低受试者血液中的ApoC3和/或ApoB水平,其中所述特征通过本文所述的方法或通过本领域技术人员已知的方法评估。

[0109] 任何Ig恒定区可用于本文公开的抗体中。在某些实施方式中,Ig区是人IgG,IgE,IgM,IgD,IgA或IgY免疫球蛋白分子,免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄,IgA₁和IgA₂)或任何亚类(例如,IgG_{2a}和IgG_{2b})。

[0110] 3. 使用方法

[0111] ApoC3抑制肝细胞摄取和清除TRL(例如VLDL)和TRL残余物,并抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如VLDL)脂解,从而起到增加受试者血液中甘油三酯水平的功能。在某些实施方式中,本文公开的抗ApoC3抗体可以减弱ApoC3抑制肝细胞摄取和清除TRL(例如VLDL)和TRL残余物的能力或减弱ApoC3抑制脂蛋白脂酶介导的TRL(例如,VLDL)脂解的能力。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于抑制受试者血液中ApoC3活性的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。在某些实施方式中,ApoC3的活性是抑制肝细胞摄取和清除TRL(例如VLDL)和TRL残余物。在某些实施方式中,ApoC3的活性是抑制脂蛋白脂酶介导的TRL脂解。在某些实施方式中,ApoC3的活性是抑制肝细胞摄取和清除TRL(例如VLDL)和TRL残余物以及抑制脂蛋白脂酶介导的TRL脂解。

[0112] 本文公开的抗ApoC3抗体可用于增加ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)从受试者血液清除的速率。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于增加ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)从受试者血液清除的速率的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。

[0113] 本文公开的抗ApoC3抗体可用于降低受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如ApoB48和/或ApoB100)的水平。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于降低受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)水平的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。在某些实施方式中,该方法使受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)的水平降低至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%,如通过本文公开的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,该方法使受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)的水平降低至少约1.1倍,1.2倍,1.3倍,1.4倍,1.5倍,2倍,2.5倍,3倍,3.5倍,4倍,4.5倍,5倍,6倍,7倍,8

倍,9倍,10倍,15倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍,如通过本文公开的方法或通过本领域技术人员已知的方法所评估。在某些实施方式中,受试者血液中ApoC3和/或ApoB(例如,ApoB48和/或ApoB100)水平的降低维持至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,18,24,30,36,42或48小时。

[0114] 所公开的抗ApoC3抗体可用于降低受试者血液中的甘油三酯水平。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于降低受试者血液中甘油三酯水平的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。

[0115] 所公开的抗ApoC3抗体可用于治疗高甘油三酯血症。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于治疗受试者的高甘油三酯血症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。在某些实施方式中,本公开提供了治疗受试者的乳糜微粒血症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。在某些实施方式中,本公开提供了治疗受试者的乳糜微粒血症综合征的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。

[0116] 所公开的抗ApoC3抗体可用于治疗和预防受试者的餐后脂血症。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于抑制受试者的餐后脂血症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。可以在餐前、餐中或餐后向受试者施用抗ApoC3抗体。

[0117] 不希望受理论束缚,申请人相信,在某些实施方式中,当在餐前、餐中或餐后施用至受试者时,本文公开的抗体能够降低受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物的水平。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于降低受试者中的餐后乳糜微粒或乳糜微粒残余物水平的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。可以在餐前、餐中或餐后向受试者施用抗ApoC3抗体。

[0118] 高甘油三酯血症患者血液中甘油三酯水平的降低可降低胰腺炎发展的风险。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于降低患有高甘油三酯血症的受试者的胰腺炎风险的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。

[0119] 所公开的抗ApoC3抗体可用于降低受试者的心血管疾病风险。因此,在某些实施方式中,本公开提供了用于降低患有高甘油三酯血症的受试者的心血管疾病风险的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物。通过施用本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物,可以降低发生与高甘油三酯血症或过度餐后脂血相关或由其引起的任何心血管疾病的风险。风险可以降低的心血管疾病包括但不限于冠状动脉疾病、动脉粥样硬化、心绞痛、心肌梗塞和中风。

[0120] 本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物可以单独施用或与另外的治疗剂组合施用。在某些实施方式中,另外的治疗剂是另一种降脂剂。任何一种或多种降脂剂可以与本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物组合使用。合适的降脂剂包括但不限于HMG-CoA还原酶抑制剂(例如,阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、罗苏伐他汀或辛伐他汀)、贝特类、烟酸、胆酸螯合剂(例如,考来烯胺、考来替泊和考来维仑)、膳食胆固醇吸收抑制剂(例如,依泽替米贝)、微粒体甘油三酯转移蛋白(MTP)抑制剂(例如,洛美他派)、植物甾醇、胰脂肪酶抑制剂(例如奥利司他)、胆固醇酯转移蛋白抑制剂、角鲨烯合成酶抑制剂(例如,TAK-475、扎拉唑酸(zaragozic acid)和RPR 107393)、ApoA-1 Milano、琥珀布可(AGI-

1067)、载脂蛋白B抑制剂(如Mipomersen)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型(PCSK9)抑制剂(例如,阿利库单抗、依伏库单抗和bococizumab)及其任何组合。在某些实施方式中,另外的降脂剂是依泽替米贝和HMG-CoA还原酶抑制剂的组合。在某些实施方式中,降脂剂是依泽替米贝、HMG-CoA还原酶抑制剂和PCSK9抑制剂的组合。

[0121] 本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物可通过多种途径递送至受试者。这些包括但不限于肠胃外、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下途径。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物为皮下或静脉内递送。

[0122] 有效治疗或预防病症的本文公开的抗ApoC3抗体或药物组合物的量将取决于疾病的性质,并且可以通过标准临床技术凭经验确定。组合物中使用的精确剂量还将取决于给药途径,以及由其引起的感染或疾病的严重性,并且应根据从业者的判断和每个受试者的情况来决定。例如,有效剂量也可以根据施用方式、目标部位、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康状况)、患者是人还是动物、施用的其他药物、或者治疗是预防性的还是治疗性的而变化。通常,患者是人,但也可以治疗包括转基因哺乳动物的非人哺乳动物。治疗剂量被优化地滴定以优化安全性和功效。

[0123] 本文所述的抗ApoC3抗体还可用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法测定生物样品中的ApoC3(例如人ApoC3)蛋白水平,所述方法包括免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或免疫印迹。合适的抗体测定标记是本领域已知的,并且包括酶标记,例如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,如碘(^{125}I , ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{121}In)和锝(^{99}Tc);发光标签,如鲁米诺;荧光标记,如荧光素和罗丹明、以及生物素。这样的标记可用于标记本文所述的抗体。或者,可以标记识别本文所述的抗ApoC3抗体的第二抗体,并将其与抗ApoC3抗体组合使用以检测ApoC3(例如人ApoC3)蛋白水平。

[0124] ApoC3(例如,人ApoC3)蛋白的表达水平的测定旨在包括直接(例如通过确定或估算绝对蛋白质水平)或相对(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白质水平相比较)地定性或定量测量或估算第一生物样品中ApoC3(例如,人ApoC3)蛋白的水平。可以测量或估算第一生物样品中的ApoC3(例如,人ApoC3)多肽表达水平,并与标准ApoC3(例如,人ApoC3)蛋白水平进行比较,该标准取自获自不具有该病症的个体的第二生物样品,或通过平均来自不具有该病症的个体人群的水平来确定。如本领域所将理解的,一旦已知“标准”ApoC3(例如人ApoC3)多肽水平,则它可以重复用作用于比较的标准。

[0125] 如本文所用,术语“生物样品”是指从受试者、细胞系、组织或潜在表达ApoC3(例如人ApoC3)的其他细胞来源获得的任何生物样品。从动物(例如人)获得组织活检和体液的方法是本领域中熟知的。生物样品包括外周单核血细胞。

[0126] 本文所述的抗ApoC3抗体可用于预后、诊断、监测和筛选应用,包括本领域技术人员熟知和标准的体外和体内应用,并且基于本说明书。用于体外评估和评价免疫系统状态或免疫应答的预测、诊断、监测和筛选测定和试剂盒可用于预测、诊断和监测以评估患者样品,包括已知具有或怀疑具有升高的ApoC3活性的患者样品。在一个实施方式中,抗ApoC3抗体可用于活组织检查样品的免疫组织化学。在另一个实施方式中,抗ApoC3抗体可用于检测ApoC3(例如人ApoC3)的水平,然后该水平可与某些疾病症状相关联。本文所述的抗ApoC3抗体可携带可检测的或功能性的标记。当使用荧光标记时,可以利用目前可用的显微镜检查和荧光激活细胞分选分析(FACS)或本领域已知的两种方法的组合来鉴定和定量特异性结

合成员。本文所述的抗ApoC3抗体可携带荧光标记。示例性荧光标记包括例如反应性和共轭探针,例如,氨基香豆素、荧光素和德克萨斯红、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗ApoC3抗体可携带放射性标记,例如同位素 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac 和 ^{186}Re 。当使用放射性标记时,可以利用本领域已知的目前可用的计数程序来鉴定和定量抗ApoC3抗体与ApoC3(例如人ApoC3)的特异性结合。在标记是酶的情况下,可以通过本领域已知的任何目前使用的比色、分光光度、荧光分光光度、电流测量或气体测定技术来完成检测。这可以通过使样品或对照样品与抗ApoC3抗体在允许抗体和ApoC3(例如人ApoC3)之间形成复合物的条件下接触来实现。检测抗体和ApoC3(例如人ApoC3)之间形成的任何复合物并在样品和对照中进行比较。本文所述的抗体也可用于通过免疫亲和纯化来纯化ApoC3(例如人ApoC3)。本文还包括测定系统,其可以以测试试剂盒的形式制备,用于定量分析例如ApoC3(例如人ApoC3)的存在程度。系统或测试试剂盒可包含标记的组分,例如标记的ApoC3抗体,和一种或多种另外的免疫化学试剂。

[0127] 4. 药物组合物

[0128] 本文提供了药物组合物,其包含在生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)中具有期望纯度的本文所述的抗ApoC3抗体。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚,丁基或苄基醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;金属配合物(例如,Zn-蛋白质配合物);或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICTM或聚乙二醇(PEG)。

[0129] 在一个具体实施方式中,药物组合物包含在药学上可接受的载体中的本文所述的抗ApoC3抗体,和任选的一种或多种另外的预防剂或治疗剂。在一个具体实施方式中,药物组合物包含在药学上可接受的载体中的有效量的本文所述抗体,和任选的一种或多种另外的预防剂或治疗剂。在一些实施方式中,抗体是药物组合物中包含的唯一活性成分。本文所述的药物组合物可用于抑制ApoC3活性和治疗病症,例如癌症或传染病。

[0130] 用于肠胃外制剂中的药学上可接受的载体包括水性载体、非水载体、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、掩蔽剂或螯合剂和其它药学上可接受的物质。水性载体的实例包括氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸林格氏注射液。非水性肠胃外载体包括植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可以将抑细菌或抑真菌浓度的抗微生物剂加入包装在多剂量容器中的肠胃外制剂中,其包括酚类或甲酚类、汞制剂、苄醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸甲酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和右旋糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。悬

浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80 (TWEEN[®] 80)。金属离子的掩蔽剂或螯合剂包括EDTA。药物载体还包括用于水混溶性载体的乙醇、聚乙二醇和丙二醇;和用于pH调节的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0131] 可以配制药物组合物用于对受试者施用的任何途径。施用途径的具体实例包括鼻内、口服、肺部、透皮、皮内和肠胃外。本文还考虑了以皮下、肌肉内或静脉内注射为特征的肠胃外施用。注射剂可以以常规形式制备,可以是液体溶液或悬浮液,适合在注射前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或者是乳剂。注射剂、溶液和乳剂还含有一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。此外,如果期望,待施用的药物组合物还可含有少量无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂和其它这样的药剂,例如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精。

[0132] 用于肠胃外施用抗体的制剂包括准备好用于注射的无菌溶液,准备在即用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产品,例如冻干粉末,包括皮下注射片剂,准备好用于注射的无菌悬浮液,准备在即用前与载体组合的无菌干燥不溶性产品和无菌乳液。溶液可以是水性溶液或非水性溶液。

[0133] 如果静脉内施用,则合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),以及含有增稠剂和增溶剂的溶液,例如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物。

[0134] 包含抗体的局部混合物如针对局部和全身施用所述制备。所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳液等,并且可以配制成乳膏剂、凝胶剂、软膏剂、乳剂、溶液剂、酏剂、洗剂、混悬剂、酞剂、糊剂、泡沫剂、气溶胶、冲洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带、皮肤贴剂或适于局部施用的任何其他制剂。

[0135] 本文所述的抗ApoC3抗体可以配制成用于局部施用的气溶胶,例如通过吸入(参见,例如,美国专利号4,044,126,4,414,209和4,364,923,其描述了用于递送可用于治疗炎性疾病(特别是哮喘)的类固醇的气溶胶)。用于施用至呼吸道的这些制剂可以是用于喷雾器的气溶胶或溶液的形式,或者是用于吹入的微细粉末,单独或与惰性载体如乳糖组合。在这种情况下,在一个实施方式中,制剂颗粒的直径小于50微米,在一个实施方式中小于10微米。

[0136] 本文所述的抗ApoC3抗体可以配制用于以凝胶、乳膏和洗液的形式局部或局部施用,例如局部施用于皮肤和粘膜,例如眼睛中,和用于施用至眼睛或用于脑池内或脊柱内施用。设想局部施用于透皮递送以及用于施用至眼睛或粘膜,或用于吸入疗法。也可以施用单独的抗体或与其他药学上可接受的赋形剂组合的鼻溶液。

[0137] 透皮贴剂,包括离子导入和电泳装置,是本领域技术人员所熟知的,并且可用于施用抗体。例如,这样的贴剂公开在美国专利号6,267,983,6,261,595,6,256,533,6,167,301,6,024,975,6,010715,5,985,317,5,983,134,5,948,433和5,860,957中。

[0138] 在某些实施方式中,包含本文所述的药物组合物是冻干粉末,其可以重构用于作为溶液、乳液和其他混合物施用。它也可以重构并配制成固体或凝胶。通过将本文所述的抗体或其药学上可接受的衍生物溶解在合适的溶剂中来制备冻干粉末。在一些实施方式中,冻干粉末是无菌的。溶剂可含有赋形剂,其改善由粉末制备的粉末或重构溶液的稳定性或其它药理学组分。可以使用的赋形剂包括但不限于右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他合适的试剂。溶剂还可含有缓冲剂,例如柠檬酸盐、磷酸钠或

磷酸钾或本领域技术人员已知的其他这样的缓冲剂,在一个实施方式中,约为中性pH。随后对溶液进行无菌过滤,然后在本领域技术人员已知的标准条件下冻干,提供期望的制剂。在一个实施方式中,将所得溶液分配到小瓶中用于冻干。每个小瓶将含有单剂量或多剂量的化合物。冻干粉末可以在适当的条件下储存,例如在约4℃至室温下。用注射用水重构该冻干粉末提供了用于肠胃外施用的制剂。为了重构,将冻干粉末加入无菌水或其他合适的载体中。精确的量取决于所选化合物。这样的量可以凭经验确定。

[0139] 本文所述的抗ApoC3抗体和本文提供的其他组合物还可以配制成靶向待治疗的受试者的身体的特定组织、受体或其他区域。许多这样的靶向方法是本领域技术人员所熟知的。本文考虑所有这些靶向方法用于本发明组合物中。对于靶向方法的非限制性实例,参见,例如,美国专利号6,316,652;6,274,552;6,271,359;6,253,872;6,139,865;6,131,570;6,120,751;6,071,495;6,060,082;6,048,736;6,039,975;6,004,534;5,985,307;5,972,366;5,900,252;5,840,674;5,759,542和5,709,874。

[0140] 用于体内施用的组合物可以是无菌的。这可以通过例如无菌过滤膜过滤而容易地完成。

[0141] 5. 多核苷酸、载体和产生抗ApoC3抗体的方法

[0142] 在另一个方面中,本文提供了包含编码本文所述的抗ApoC3抗体(例如,轻链可变区或重链可变区)的核苷酸序列的多核苷酸,和载体,例如包含用于在宿主细胞(例如,大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达的这样的多核苷酸的载体。

[0143] 如本文所用,“分离的”多核苷酸或核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源(例如,小鼠或人)中的其他核酸分子分离的多核苷酸或核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,例如cDNA分子,当通过重组技术产生时基本上不含其他细胞物质或培养基,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。例如,术语“基本上不含”包括具有少于约15%,10%,5%,2%,1%,0.5%或0.1%(特别是少于约10%)的其他材料(例如细胞材料、培养基、其他核酸分子、化学前体或其他化学品)的多核苷酸或核酸分子的制备物。在一个具体实施方式中,分离或纯化编码本文所述抗体的核酸分子。

[0144] 在特定方面中,本文提供了包含编码特异性结合ApoC3(例如,人ApoC3)多肽并包含如本文所述的氨基酸序列的抗体、以及与这样的抗体竞争结合ApoC3(例如,人ApoC3)多肽(例如,以剂量依赖性方式)的抗体、或与这样的抗体结合相同的表位的抗体的核苷酸序列的多核苷酸。

[0145] 在某些方面中,本文提供了包含编码本文所述抗体的轻链或重链的核苷酸序列的多核苷酸。多核苷酸可包含编码本文所述抗体的VH、VL或CDR(参见,例如,本文表1-4)的核苷酸序列。

[0146] 本文还提供了编码抗ApoC3抗体的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化,用异源信号序列替换,和消除mRNA不稳定性元件而进行优化。通过引入密码子改变或消除mRNA中的抑制区域来产生编码用于重组表达的抗ApoC3抗体(例如,轻链、重链、VH结构域或VL结构域)的优化核酸的方法可以通过相应改造例如美国专利号5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132;和6,794,498中描述的优化方法来进行。例如,可以突变RNA内的潜在剪接位点和不稳定性元件(例如,A/T或A/U富集元件)而不改变由核酸序列编码的氨基酸,以增加RNA的重组表达的稳定性的。这些改变利用遗传密码的简并性,例如,使用针对相同氨基酸

的替代性密码子。在一些实施方式中,可以期望的是改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如具有与原始氨基酸相似的化学结构和性质或功能的类似氨基酸。这样的方法可使抗ApoC3的表达相对于未经优化的多核苷酸所编码的抗ApoC3抗体的表达增加至少1倍,2倍,3倍,4倍,5倍,10倍,20倍,30倍,40倍,50倍,60倍,70倍,80倍,90倍或100倍或更多倍。

[0147] 在某些实施方式中,编码本文所述的抗ApoC3抗体(例如,VL结构域或VH结构域)的优化的多核苷酸序列可以与编码本文所述的抗ApoC3抗体(例如,VL结构域或VH结构域)的未优化的多核苷酸序列的反义(例如,互补)多核苷酸杂交。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗ApoC3抗体或片段的优化的核苷酸序列在高度严格条件下与编码本文所述的抗ApoC3抗体的未优化的多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在一个具体实施方式中,编码本文所述抗ApoC3抗体的优化核苷酸序列在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文所述抗ApoC3抗体的未优化核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。已经描述了关于杂交条件的信息,参见例如美国专利申请公开号US 2005/0048549(例如,第72-73段),其通过引用并入本文。

[0148] 可以通过本领域已知的任何方法获得多核苷酸,并确定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文所述抗体(例如表1中描述的抗体)以及这些抗体的修饰形式的核苷酸序列可以使用本领域熟知的方法确定,即,已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以这样的方式组装以产生编码抗体的核酸。编码抗体的这种多核苷酸可以由化学合成的寡核苷酸组装(例如,如Kutmeier G等,(1994),BioTechniques 17:242-6中所述),简言之,其涉及含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸的合成,退火和连接那些寡核苷酸,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0149] 或者,可以使用本领域熟知的方法(例如,PCR和其他分子克隆方法)从来自合适来源(例如杂交瘤)的核酸产生编码本文所述抗体的多核苷酸。例如,可以使用从产生感兴趣的抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA,使用可与已知序列的3'和5'末端杂交的合成引物进行PCR扩增。这样的PCR扩增方法可用于获得包含编码抗体轻链或重链的序列的核酸。这样的PCR扩增方法可用于获得包含编码抗体的可变轻链区或可变重链区的序列的核酸。可以将扩增的核酸克隆到载体中以便在宿主细胞中表达以及进一步克隆,例如,以产生嵌合和人源化抗体。

[0150] 如果含有编码特定抗体的核酸的克隆体不是可得的,但抗体分子的序列是已知的,则可以化学合成或从合适的来源获得编码免疫球蛋白的核酸(例如,从表达抗体的任何组织或细胞产生的抗体cDNA文库或cDNA文库,或从表达抗体的任何组织或细胞分离的核酸,优选聚腺苷酸+RNA,所述组织或细胞例如是经选择以表达本文所述抗体的杂交瘤细胞),其是通过使用可与序列的3'和5'末端杂交的合成引物进行PCR扩增,或通过使用对特定基因序列特异的寡核苷酸探针进行克隆,以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆体。然后可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR产生的扩增核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0151] 编码本文所述的抗ApoC3(例如,人ApoC3)抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗ApoC3(例如,人ApoC3)抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以作为这种DNA的来源。一经分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将其转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢

(CHO) 细胞 (例如, 来自 CHO GS System™ 的 CHO 细胞 (Lonza))、或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中, 以获得重组宿主细胞中抗 ApoC3 (例如人 ApoC3) 抗体的合成。

[0152] 为了产生完整抗体, 可以使用包含 VH 或 VL 核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的 PCR 引物来扩增 scFv 克隆体中的 VH 或 VL 序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术, 可以将 PCR 扩增的 VH 结构域克隆到表达重链恒定区例如人 γ 4 恒定区的载体中, 并且可以将 PCR 扩增的 VL 结构域克隆到表达轻链恒定区例如人 κ 或 λ 恒定区的载体中。在某些实施方式中, 用于表达 VH 或 VL 结构域的载体包含 EF-1 α 启动子、分泌信号、可变区的克隆位点、恒定结构域和选择标记如新霉素。还可以将 VH 和 VL 结构域克隆到表达必要的恒定区的一个载体中。然后将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中, 以使用本领域技术人员已知的技术产生表达全长抗体 (例如 IgG) 的稳定或瞬时细胞系。

[0153] 还可以修饰 DNA, 例如, 通过用人重链和轻链恒定结构域编码序列取代鼠序列, 或通过全部或部分的非免疫球蛋白多肽的编码序列共价连接至免疫球蛋白编码序列。

[0154] 还提供了在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文所述抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在具体的实施方式中, 本文所述的多核苷酸在高严格性、中等或较低严格性杂交条件下与编码本文提供的 VH 结构域或 VL 结构域的多核苷酸杂交。

[0155] 杂交条件已在本领域中描述, 并且是本领域技术人员已知的。例如, 在严格条件下的杂交可以包括在约 45°C 下与 6 \times 氯化钠/柠檬酸钠 (SSC) 中的滤器结合的 DNA 杂交, 然后在约 50–65°C 下在 0.2 \times SSC/0.1% SDS 中进行一次或多次洗涤; 在高度严格条件下的杂交可以包括在约 45°C 下在 6 \times SSC 中与滤器结合的核酸杂交, 然后在约 68°C 下在 0.1 \times SSC/0.2% SDS 中进行一次或多次洗涤。在其他严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知的并且已有描述, 参见, 例如, Ausubel FM 等编, (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc., New York, 6.3.1–6.3.6 和 2.10.3 页。

[0156] 在某些方面中, 本文提供了表达 (例如, 重组表达) 特异性结合 ApoC3 (例如人 ApoC3) 的本文所述的抗体的细胞 (例如, 宿主细胞) 以及相关的多核苷酸和表达载体。本文提供了用于在宿主细胞中, 优选在哺乳动物细胞中重组表达的包含多核苷酸的载体 (例如, 表达载体), 所述多核苷酸包含编码抗 ApoC3 (例如人 ApoC3) 抗体或片段的核苷酸序列。本文还提供了宿主细胞, 其包含用于重组表达本文所述的抗 ApoC3 (例如人 ApoC3) 抗体 (例如人或人源化抗体) 的载体。在一个具体方面中, 本文提供了用于产生本文所述抗体的方法, 其包括从宿主细胞表达这种抗体。

[0157] 特异性结合 ApoC3 (例如, 人 ApoC3) 的本文所述的抗体 (例如, 本文所述的全长抗体、抗体的重链或轻链、或单链抗体) 的重组表达涉及构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本文所述的抗体分子、抗体的重链或轻链 (例如, 重链或轻链可变区) 的多核苷酸, 则可以使用本领域众所周知的技术通过重组 DNA 技术产生用于产生抗体分子的载体。因此, 本文描述了通过表达含有抗体或抗体片段 (例如, 轻链或重链) 编码核苷酸序列的多核苷酸来制备蛋白质的方法。可以使用本领域技术人员熟知的方法构建含有抗体或抗体片段 (例如轻链或重链) 编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括, 例如, 体外重组 DNA 技术、合成技术和体内遗传重组。还提供了可复制载体, 其包含与启动子可操作地连接的, 编码本文所述抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体的重链或轻链可变

区、或重链或轻链CDR的核苷酸序列。这样的载体可以例如包含编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开号W0 86/05807和W0 89/01036;和美国专利号5,122,464),并且可以将抗体的可变区克隆到这样的载体中,以表达整个重链、整个轻链、或整个重链和轻链。

[0158] 可以通过常规技术将表达载体转移至细胞(例如宿主细胞),然后可以通过常规技术培养所得细胞以产生本文所述的抗体。因此,本文提供了含有编码本文所述的抗体、或其重链或轻链、或其片段、或本文所述的单链抗体的多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸可操作地连接至启动子以用于在宿主细胞中表达这样的序列。在某些实施方式中,对于双链抗体的表达,单独编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子,如下文详述。在某些实施方式中,宿主细胞含有载体,所述载体包含编码本文所述抗体的重链和轻链二者的多核苷酸。在具体的实施方式中,宿主细胞含有两种不同的载体,第一载体包含编码本文所述抗体的重链或重链可变区、或其片段的多核苷酸,且第二载体包含编码本文所述抗体的轻链或轻链可变区、或其片段的多核苷酸。在其他实施方式中,第一宿主细胞包含第一载体,所述第一载体包含编码本文所述抗体的重链或重链可变区、或其片段的多核苷酸,且第二宿主细胞包含第二载体,所述第二载体包含编码本文所述抗体的轻链或轻链可变区的多核苷酸。在具体的实施方式中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区相关联以形成本文所述的抗ApoC3抗体。在某些实施方式中,本文提供了包含这样的第一宿主细胞和这样的第二宿主细胞的宿主细胞群。

[0159] 在一个特别实施方式中,本文提供了载体群,其包含第一载体和第二载体,所述第一载体包含编码本文所述的抗ApoC3抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸,所述第二载体包含编码本文所述的抗ApoC3抗体的重链/重链可变区的多核苷酸。

[0160] 多种宿主表达载体系统可用于表达本文所述的抗体分子(参见,例如,美国专利号5,807,715)。这样的宿主表达系统代表可以通过其产生并随后纯化感兴趣的编码序列的载体,但也代表当用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,可以原位表达本文所述的抗体分子的细胞。这些包括但不限于微生物,例如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母);用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻,例如莱茵衣藻);或携有含有源自哺乳动物细胞基因组(例如,金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS),CHO,BHK,MDCK,HEK 293,NS0,PER.C6,VERO,CRL7030,HsS78Bst,HeLa,和NIH 3T3,HEK-293T,HepG2,SP210,R1.1,B-W,L-M,BSC1,BSC40,YB/20和BMT10细胞)。在一个具体实施方式中,用于表达本文所述抗体的细胞是CHO细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在一个特别实施方式中,用于表达本文所述抗体的细胞是人细胞,例如人细胞系。在一个具体实施方式中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在一个特别实施方式中,将细菌细胞(如大肠杆菌)或真核细胞(如哺乳动物细胞),尤其是用于表达完整重组抗体分子的细胞,用于表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞连

同诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件的载体是抗体的有效表达系统 (Foecking MK&Hofstetter H (1986) *Gene* 45:101-5; 和Cockett MI等, (1990) *Biotechnology* 8 (7):662-7)。在某些实施方式中,本文描述的抗体由CHO细胞或NS0细胞产生。在一个具体实施方式中,编码特异性结合ApoC3 (例如人ApoC3) 的本文所述抗体的核苷酸序列的表达受到组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子的调节。

[0161] 在细菌系统中,可以有利地选择许多表达载体,这取决于所表达的抗体分子的预期用途。例如,当要产生大量这样的抗体时,对于抗体分子的药物组合物的产生,可能需要指导易于纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体。这样的载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278 (Ruether U&Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2:1791-1794), 其中抗体编码序列可以单独连接到载体中,与lac Z编码区构成框架,从而产生融合蛋白;pIN载体 (Inouye S&Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13:3101-3109; Van Heeke G&Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24:5503-5509); 等等。例如,pGEX载体也可用于表达外源多肽作为与谷胱甘肽S-转移酶 (GST) 的融合蛋白。通常,这样的融合蛋白是可溶的,并且可以通过吸附和结合基质谷胱甘肽琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽的存在下洗脱而容易地从裂解细胞纯化。设计pGEX载体以包含凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0162] 在昆虫系统中,例如,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 可用作载体以表达外源基因。病毒在草地贪夜蛾细胞中生长。可以将抗体编码序列单独克隆到病毒的非必要区域 (例如多角体蛋白基因) 中,并置于AcNPV启动子 (例如多角体蛋白启动子) 的控制下。

[0163] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用许多基于病毒的表达系统。在使用腺病毒作为表达载体的情况下,可以将感兴趣的抗体的编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后可以通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必要区域 (例如,E1或E3区) 将产生重组病毒,其可存活并且能够在受感染的宿主中表达抗体分子 (例如,参见Logan J&Shenk T (1984) *PNAS* 81 (12):3655-9)。为了有效翻译插入的抗体编码序列,也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与期望的编码序列的阅读框同相,以确保整个插入物的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然和合成的多种来源。通过包含合适的转录增强子元件、转录终止子等可以增强表达效率 (参见,例如,Bitter G等, (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544)。

[0164] 此外,可以选择宿主细胞株,其调节插入序列的表达,或以期望的特定方式修饰和加工基因产物。蛋白质产物的这样的修饰 (例如,糖基化) 和加工 (例如,切割) 对于蛋白质的功能可以是重要的。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于适当加工初级转录物、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO, VERO, BHK, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20和T47D, NS0 (不内源性产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系), CRL7030, COS (例如,COS1或COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施方式中,本文所述的抗ApoC3 (例如,人ApoC3) 抗体在哺乳动物细胞如CHO细胞中产生。

[0165] 在一个具体实施方式中,本文所述的抗体具有降低的岩藻糖含量或无岩藻糖含量。可以使用本领域技术人员已知的技术生产这样的抗体。例如,抗体可以在缺乏或缺少岩藻糖基化能力的细胞中表达。在一个具体实例中,具有 $\alpha 1,6$ -岩藻糖基转移酶的等位基因两者的敲除的细胞系可用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体。**Potelligent[®]**系统(Lonza)是可用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体的这样的系统的一个实例。

[0166] 对于重组蛋白的长期高产量生产,可以产生稳定的表达细胞。例如,可以改造稳定表达本文所述的抗ApoC3抗体的细胞系。在具体的实施方式中,本文提供的细胞稳定表达轻链/轻链可变区和重链/重链可变区,其结合以形成本文所述的抗体。

[0167] 在某些方面中,不是使用含有病毒复制起点的表达载体,而是可以用通过适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的DNA和可选择标记物转化宿主细胞。在引入外源DNA/多核苷酸后,可使工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转换为选择性培养基。重组质粒中的可选择标记物赋予对选择的抗性,并允许细胞将质粒稳定整合到它们的染色体中并生长以形成病灶(foci),而病灶又可以克隆并扩增到细胞系中。该方法可有利地用于工程化表达本文所述的抗ApoC3抗体的细胞系。这样的工程细胞系可特别用于筛选和评估与抗体分子直接或间接相互作用的组合物。

[0168] 可以使用许多选择系统,其包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等,(1977)Cell 11(1):223-32),次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska EH&Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy I等,(1980)Cell 22(3):817-23)基因,其分别在tk⁻、hgp⁺或ap⁺细胞中。此外,抗代谢物抗性可用作以下基因的选择基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler M等,(1980)PNAS 77(6):3567-70;O'Hare K等,(1981)PNAS 78:1527-31);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan RC&Berg P(1981)PNAS 78(4):2072-6);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu GY&Wu CH(1991)Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596;Mulligan RC(1993)Science 260:926-932;和Morgan RA&Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191-217;Nabel GJ&Felgner PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211-5);和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre RF等,(1984)Gene 30(1-3):147-56)。可以常规应用重组DNA技术领域通常已知的方法来选择期望的重组克隆体,并且这样的方法描述于例如以下中:Ausubel FM等,(编),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,NY(1993);Kriegler M,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);和第12和13章中,Dracopoli NC等,(编),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colbère-Garapin F等,(1981)J Mol Biol 150:1-14,其全部内容通过引用并入本文。

[0169] 通过载体扩增可以增加抗体分子的表达水平(综述参见Bebbington CR&Hentschel CCG,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,Vol.3(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记物是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相关,抗体的产生也将增加(Crouse GF等,(1983)Mol Cell Biol 3:257-66)。

[0170] 可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染宿主细胞,第一载体编码重链来

源的多肽,且第二载体编码轻链来源的多肽。两种载体可含有相同的可选择标记物,其能够实现重链和轻链多肽的相等表达。可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染宿主细胞。例如,宿主细胞可以用任何一种以下比率的第一表达载体和第二表达载体来转染:1:1,1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:8,1:9,1:10,1:12,1:15,1:20,1:25,1:30,1:35,1:40,1:45或1:50。

[0171] 或者,可以使用单一载体,其编码并且能够表达重链和轻链多肽两者。在这样的情况下,轻链应放置在重链之前,以避免过量的无毒重链(Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565;和Köhler G (1980) PNAS 77:2197-2199)。重链和轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子或多顺反子。多顺反子核酸构建体可编码2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个,或2-5、5-10或10-20个范围内的基因/核苷酸序列。例如,双顺反子核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因(例如,本文所述抗体的重链)和第二基因(例如本文所述抗体的轻链)。在这样的表达载体中,基因两者的转录可以由启动子驱动,而来自第一基因的mRNA的翻译可以通过帽依赖性扫描机制(cap-dependent scanning mechanism),并且来自第二基因的mRNA的翻译可以通过帽非依赖性机制(cap-independent scanning mechanism),例如通过IRES。

[0172] 一旦通过重组表达产生本文所述的抗体分子,则可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法纯化,例如通过色谱(例如,离子交换、亲和力(特别是通过蛋白质A后对特定抗原的亲和力)和尺寸排阻柱色谱)、离心、差异溶解度、或通过任何其他用于纯化蛋白质的标准技术。此外,本文描述的抗体可以与本文所述的异源多肽序列或本领域已知的其他多肽序列融合以促进纯化。

[0173] 在具体的实施方式中,分离或纯化本文所述的抗体。通常,分离的抗体是基本上不含具有与分离的抗体不同的抗原特异性的其他抗体的抗体。例如,在一个特别实施方式中,本文所述抗体的制剂基本上不含细胞物质或化学前体。术语“基本上不含细胞物质”包括抗体的制备物,其中抗体与从其分离或重组产生的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括抗体的制备物,其具有少于约30%,20%,10%,5%,2%,1%,0.5%或0.1%(以干重计)的异源蛋白质(在本文中也称为“污染蛋白质”)或抗体的变体,例如,抗体的不同翻译后修饰形式或抗体的其他不同形式(例如,抗体片段)。当重组产生抗体时,它通常也基本上不含培养基,即培养基占蛋白质制备物的体积小于约20%,10%,2%,1%,0.5%或0.1%。当通过化学合成产生抗体时,其通常基本上不含化学前体或其他化学物质,即,它与参与蛋白质合成的化学前体或其他化学物质分离。因此,这样的抗体制备物具有少于约30%,20%,10%或5%(以干重计)的化学前体或除感兴趣的抗体之外的化合物。在一个具体实施方式中,分离或纯化本文所述的抗体。

[0174] 特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)的抗体可以通过本领域已知的用于合成抗体的任何方法产生,例如通过化学合成或通过重组表达技术。除非另有说明,否则本文所述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交以及本领域技术范围内的相关领域的常规技术。例如,这些技术在本文引用的参考文献中有所描述,并在文献中有充分说明。参见,例如Maniatis T等,(1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J等,(1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring

Harbor Laboratory Press; Sambrook J等, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM等, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987年和年度更新); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987年和年度更新) Gait (编) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (编) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B等, (编) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0175] 在一个具体实施方式中, 本文所述的抗体是通过任何方式制备、表达、产生或分离的抗体(例如重组抗体), 所述方式包括例如通过DNA序列的合成、基因工程的产生。在某些实施方式中, 这样的抗体包含不天然存在于动物或哺乳动物(例如人)体内的抗体种系库内的序列(例如, DNA序列或氨基酸序列)。

[0176] 在一个方面中, 本文提供了制备特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)的抗体的方法, 其包括培养本文所述的细胞或宿主细胞。在某个方面中, 本文提供了制备特异性结合ApoC3(例如, 人ApoC3)的抗体的方法, 其包括使用本文所述的细胞或宿主细胞(例如, 包含编码本文所述抗体的多核苷酸的细胞或宿主细胞)表达(例如, 重组表达)抗体。在一个特别实施方式中, 细胞是分离的细胞。在一个特别实施方式中, 已将外源多核苷酸引入细胞中。在一个特别实施方式中, 该方法还包括纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体的步骤。

[0177] 用于产生多克隆抗体的方法是本领域已知的(参见, 例如, Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 第5版, Ausubel FM等编, John Wiley and Sons, New York中的第11章)。

[0178] 可以使用本领域已知的多种技术制备单克隆抗体, 包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术, 或其组合。例如, 单克隆抗体可以使用杂交瘤技术产生, 包括本领域已知的那些技术, 并且例如在Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling GJ等: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中教导。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。例如, 单克隆抗体可以从外源表达本文所述抗体(例如, 这样的抗体的轻链或重链)的宿主细胞重组产生。

[0179] 在具体的实施方式中, 如本文所用的“单克隆抗体”是由单细胞(例如, 产生重组抗体的杂交瘤或宿主细胞)产生的抗体, 其中所述抗体特异性结合ApoC3(例如, 人ApoC3), 如例如通过ELISA或本领域已知的或本文提供的实施例中的其他抗原结合或竞争性结合测定所确定。在特定的实施方式中, 单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施方式中, 单克隆抗体是单价抗体或多价(例如, 二价)抗体。在特定的实施方式中, 单克隆抗体是单特异性或多特异性抗体(例如, 双特异性抗体)。本文所述的单克隆抗体可以例如通过如Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495中描述的杂交瘤方法制备, 或者可以例如使用如本文所述的技术从噬菌体文库分离。用于制备克隆细胞系和由其表达的单克隆抗体的其他方法是本领域熟知的(参见, 例如, 以下中的第11章: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 第5版, Ausubel FM等, 同上)。

[0180] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是常规的, 并且是本领域熟知的。

例如,在杂交瘤方法中,对小鼠或其他合适的宿主动物,例如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴进行免疫,以引发产生或能够产生特异性结合用于免疫的蛋白质(例如,ApoC3(例如,人ApoC3))的抗体的淋巴细胞。或者,可以在体外对淋巴细胞进行免疫。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding JW(编), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。另外,RIMMS(重复免疫多位点)技术可用于对动物进行免疫(Kilpatrick KE等, (1997) *Hybridoma* 16:381-9,其全部内容通过引用并入)。

[0181] 在一些实施方式中,小鼠(或其他动物,例如大鼠、猴、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗)可以用抗原(例如,ApoC3(例如,人ApoC3))进行免疫,并且一旦检测到免疫应答,例如,在小鼠血清中检测到抗原特异性抗体,则收获小鼠脾脏并分离脾细胞。然后通过熟知的技术将脾细胞融合至任何合适的骨髓瘤细胞,例如来自可获自美国典型培养物保藏中心(ATCC®)(Manassas,VA)的细胞系SP20的细胞,以形成杂交瘤。选择杂交瘤并通过有限稀释克隆。在某些实施方式中,收获免疫小鼠的淋巴结并与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0182] 将由此制备的杂交瘤细胞接种和生长在合适的培养基中,所述培养基优选含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基),这些物质防止HGPRT缺乏细胞的生长。

[0183] 具体实施方式使用有效融合的,通过选择的抗体生成细胞支持稳定的高水平抗体产生,并且对诸如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些骨髓瘤细胞系中的是小鼠骨髓瘤细胞系,例如NS0细胞系或源自可获自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,以及可获得自美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD, USA的SP-2或X63-Ag8.653细胞。人骨髓瘤和小鼠-人异骨髓瘤细胞系也已被描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor D(1984) *J Immunol* 133:3001-5; Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0184] 对其中杂交瘤细胞生长的培养基测定针对ApoC3(例如人ApoC3)的单克隆抗体的产生。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性为通过本领域已知的方法测定,例如免疫沉淀或通过体外结合测定,例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0185] 在鉴定产生具有期望的特异性、亲和力或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可通过有限稀释程序亚克隆克隆体并通过标准方法培养Goding JW(编), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 同上)。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI 1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在体内作为动物的腹水肿瘤生长。

[0186] 通过常规免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,将通过亚克隆体分泌的单克隆抗体适当地与培养基、腹水或血清分离。

[0187] 本文所述的抗体包括识别特定ApoC3(例如人ApoC3),并且可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生的抗体片段。例如,本文所述的Fab和F(ab')₂片段可以通过使用酶如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')₂片段)蛋白水解切割免疫球蛋白分子来产生。Fab片段对应于抗体分子的两个相同臂中的一个,并含有与重链的VH和CH1

结构域配对的完整轻链。F(ab')₂片段含有通过铰链区中的二硫键连接的抗体分子的两个抗原结合臂。

[0188] 此外,还可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法产生本文所述的抗体。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特别地,编码VH和VL结构域的DNA序列从动物cDNA文库(例如受影响组织的人或鼠cDNA文库)扩增。通过PCR将编码VH和VL结构域的DNA与scFv接头一起重组,并克隆到噬菌粒载体中。将载体在大肠杆菌中电穿孔,并用辅助噬菌体感染大肠杆菌。在这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13,并且VH和VL结构域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。可以用抗原选择或鉴定表达结合特定抗原的抗原结合结构域的噬菌体,例如使用结合或捕获至固体表面或珠的标记抗原或抗原。可用于制备本文所述抗体的噬菌体展示方法的实例包括以下中公开的那些:Brinkman U等,(1995) J Immunol Methods 182:41-50;Ames RS等,(1995) J Immunol Methods 184:177-186;Kettleborough CA等,(1994) Eur J Immunol 24:952-958;Persic L等,(1997) Gene 187:9-18;Burton DR&Barbas CF (1994) Advan Immunol 57:191-280;PCT申请号PCT/GB91/001134;国际公开号WO 90/02809,WO 91/10737,WO 92/01047,WO 92/18619,WO 93/1 1236,WO 95/15982,WO 95/20401和WO 97/13844;以及美国专利号5,698,426,5,223,409,5,403,484,5,580,717,5,427,908,5,750,753,5,821,047,5,571,698,5,427,908,5,516,637,5,780,225,5,658,727,5,733,743和5,969,108。

[0189] 如上述参考文献中所述,在噬菌体选择后,可以分离来自噬菌体的抗体编码区并用于产生完整抗体,包括人抗体或任何其他期望的抗原结合片段,并在任何期望宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如,如下文所述。重组产生抗体片段如Fab、Fab' 和F(ab')₂片段的技术也可以使用本领域已知的方法,例如PCT公开号WO 92/22324;Mullinax RL等,(1992) BioTechniques 12(6):864-9;Sawai H等,(1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34;和Better M等,(1988) Science 240:1041-1043中公开的那些。

[0190] 在某些实施方式中,为了产生完整抗体,可以使用包含VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物来从模板,例如,scFv克隆体,扩增VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,可以将PCR扩增的VH结构域克隆到表达VH恒定区的载体中,并且可以将PCR扩增的VL结构域克隆到表达VL恒定区(例如人κ或λ恒定区)的载体中。还可以将VH和VL结构域克隆到表达必要恒定区的一个载体中。然后将重链转化载体和轻链转化载体共转染到细胞系中,以使用本领域技术人员已知的技术产生表达全长抗体(例如IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0191] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分源自不同免疫球蛋白分子的分子。例如,嵌合抗体可含有与人抗体恒定区融合的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,Morrison SL(1985) Science 229:1202-7;Oi VT&Morrison SL(1986) BioTechniques 4:214-221;Gillies SD等,(1989) J Immunol Methods 125:191-202;和美国专利号5,807,715,4,816,567,4,816,397和6,331,415。

[0192] 人源化抗体能够结合预定抗原,并且其包含基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的框架区和基本上具有非人免疫球蛋白(例如,鼠免疫球蛋白)氨基酸序列的CDR。在特别的实施方式中,人源化抗体还包含免疫球蛋白(通常是人免疫球蛋白)恒定区(Fc)的至少一部

分。抗体还可包含重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。人源化抗体可选自任何类别的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。可以使用本领域已知的多种技术产生人源化抗体,包括但不限于CDR-移植(欧洲专利号EP 239400;国际公开号W0 91/09967;和美国专利号5,225,539,5,530,101和5,585,089),饰面(veneering)或重饰(resurfacing)(欧洲专利号EP 592106和EP 519596;Padlan EA(1991) Mol Immunol 28(4/5):489-498;Studnicka GM等,(1994) Prot Engineering 7(6):805-814;和Roguska MA等,(1994) PNAS 91:969-973),链改组(美国专利号5,565,332),和例如以下中公开的技术:美国专利号6,407,213,美国专利号5,766,886,国际公开号W0 93/17105;Tan P等,(2002) J Immunol 169:1119-25;Caldas C等,(2000) Protein Eng.13(5):353-60;Morea V等,(2000) Methods 20(3):267-79;Baca M等,(1997) J Biol Chem 272(16):10678-84;Roguska MA等,(1996) Protein Eng 9(10):895904;Couto JR等,(1995) Cancer Res.55(23Supp):5973s-5977s;Couto JR等,(1995) Cancer Res 55(8):1717-22;Sandhu JS(1994) Gene 150(2):409-10和Pedersen JT等,(1994) J Mol Biol 235(3):959-73。还参见美国申请公开号2005/0042664 A1(2005年2月24日),其通过引用整体并入本文。

[0193] 已经描述了制备多特异性(例如双特异性抗体)的方法,参见,例如,美国专利号7,951,917;7,183,076;8,227,577;5,837,242;5,989,830;5,869,620;6,132,992和8,586,713。

[0194] 单域抗体,例如缺乏轻链的抗体,可以通过本领域熟知的方法产生。参见Riechmann L&Muyldermans S(1999) J Immunol 231:25-38;Nuttall SD等,(2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3):253-263;Muyldermans S,(2001) J Biotechnol 74(4):277-302;美国专利号6,005,079;和国际公开号W0 94/04678,W0 94/25591和W0 01/44301。

[0195] 此外,特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)抗原的抗体又可用于产生抗独特型抗体,其使用本领域技术人员熟知的技术“模拟”抗原(参见,例如,Greenspan NS&Bona CA(1989) FASEB J 7(5):437-444;和Nissinoff A(1991) J Immunol 147(8):2429-2438)。

[0196] 在特别的实施方式中,与本文所述的抗ApoC3抗体结合相同的ApoC3(例如人ApoC3)表位的本文所述的抗体是人抗体。在特别的实施方式中,竞争性地阻断(例如,以剂量依赖性方式)本文所述的任何一种抗体与ApoC3(例如人ApoC3)的结合的本文所述的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的任何方法产生人抗体。例如,可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。特别地,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机引入或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。或者,除人重链和轻链基因外,还可将人可变区、恒定区和多样性区引入小鼠胚胎干细胞。通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座,可以使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因单独或同时失去功能。特别地,J_H区的纯合缺失阻止了内源性抗体的产生。将修饰的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚胎中以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合子代。用选择的抗原,例如抗原(例如ApoC3(例如人ApoC3))的全部或部分,以正常方式免疫化转基因小鼠。可以使用常规杂交瘤技术从免疫化转基因小鼠获得针对抗原的单克隆抗体。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,可以产生治疗上有用的IgG,IgA,IgM和IgE抗体。关于用于产生人抗体的该技术的综述,参见Lonberg N&Huszar D(1995) Int Rev Immunol 13:65-93。关于用于产生人抗体

和人单克隆抗体的该技术以及用于产生这样的抗体的方案的详细讨论,参见例如,国际公开号W0 98/24893,W0 96/34096和W0 96/33735;和美国专利号5,413,923,5,625,126,5,633,425,5,569,825,5,661,016,5,545,806,5,814,318和5,939,598。能够产生人抗体的小鼠的实例包括XenomouseTM(Abgenix,Inc.;美国专利号6,075,181和6,150,184),HuAb-MouseTM(Mederex,Inc./Gen Pharm;美国专利号5,545,806和5,569,825),Trans Chromo MouseTM(Kirin)和KM MouseTM(Medarex/Kirin)。

[0197] 特异性结合ApoC3(例如人ApoC3)的人抗体可通过本领域已知的多种方法制备,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的上述噬菌体展示方法。还参见美国专利号4,444,887,4,716,111和5,885,793;以及国际公开号W0 98/46645,W0 98/50433,W0 98/24893,W0 98/16654,W0 96/34096,W0 96/33735和W0 91/10741。

[0198] 在一些实施方式中,可以使用小鼠-人杂交瘤产生人抗体。例如,用Epstein-Barr病毒(EBV)转化的人外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生分泌人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤,并且可以筛选这些小鼠-人杂交瘤以确定分泌特异性结合靶抗原(例如,ApoC3(例如,人ApoC3))的人单克隆抗体的那些。这样的方法是已知的并且在本领域中有描述,参见例如Shinmoto H等,(2004) Cytotechnology 46:19-23;Naganawa Y等,(2005) Human Antibodies 14:27-31。

[0199] 6. 试剂盒

[0200] 还提供了包括一种或多种本文所述抗体或其药物组合物或缀合物的试剂盒。在一个具体实施方式中,本文提供药物包或试剂盒,其包括一个或多个容器,所述容器填充有本文所述药物组合物的成分中的一种或多种,例如本文提供的一种或多种抗体。在一些实施方式中,试剂盒含有本文所述的药物组合物和任何预防剂或治疗剂,例如本文所述的那些。任选地与这样的容器相关联的可以由管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构所规定形式的通告,该通告反映了该机构对制造、使用或销售用于人类施用的批准。

[0201] 还提供了可用于上述方法中的试剂盒。在一个实施方式中,试剂盒在一个或多个容器中包含本文所述的抗体,优选纯化的抗体。在一个具体实施方式中,本文所述的试剂盒含有基本上分离的ApoC3(例如人ApoC3)抗原作为对照。在另一个具体实施方式中,本文所述的试剂盒还包含不与ApoC3(例如人ApoC3)抗原反应的对照抗体。在另一个具体实施方式中,本文所述的试剂盒含有用于检测抗体与ApoC3(例如人ApoC3)抗原结合的一种或多种要素(例如,抗体可以与可检测的底物(例如荧光化合物、酶促底物、放射性化合物或发光化合物)缀合,或识别第一抗体的第二抗体可与可检测的底物缀合)。在具体的实施方式中,本文提供的试剂盒可包括重组产生的或化学合成的ApoC3(例如人ApoC3)抗原。试剂盒中提供的ApoC3(例如人ApoC3)抗原也可以附着在固体支持物上。在一个更具体的实施方式中,上述试剂盒的检测手段包括附着有ApoC3(例如人ApoC3)抗原的固体支持物。这样的试剂盒还可包括未附着的报告子标记的抗人抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在此实施方式中,可以通过所述报告子标记的抗体的结合来检测抗体与ApoC3(例如人ApoC3)抗原的结合。

[0202] 实施例

[0203] 提供本节中的实施例是为了进一步阐明本申请的优点和特征,但不旨在限制本申请的范围。这些实施例仅用于说明目的。

[0204] 实施例1:从免疫化动物构建抗ApoC3抗体噬菌体展示文库

[0205] 本实施例描述了抗ApoC3抗体文库的初始构建。从人血清中纯化的人ApoC3 (huApoC3) 蛋白获得自Athens Research and Technology。该huApoC3蛋白用于本实施例以及某些以下实施例中。HuApoC3与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 脂质体复合, 以紧密模拟生理学相关构象。按照Klarenbeek及同事描述的程序 (Klarenbeek等, Protein Eng Des Sel (2016) 29 (4):123-133), 通过肌肉注射用6剂量的huApoC3与弗氏不完全佐剂, 使两只美洲驼免疫化, 所述文献通过引用整体并入本文。免疫日程包括每周各自注射前两个剂量的100 μ g huApoC3和各自注射另外四个剂量的50 μ g huApoC3, 然后各自注射两次加强剂量的50 μ g huApoC3。加强后从免疫化美洲驼的血液样品中分离外周血淋巴细胞。提取总RNA并用作用于制备用随机引物扩增的cDNA文库的模板。如前所述, 扩增抗体库并且克隆体作为scFv噬菌体展示文库 (Van der Woning等, DNA immunization combined with scFv phage display identifies antagonistic GCGR specific antibodies and reveals new epitopes on the small extracellular loops. (2016) mAbs, 8 (6):1126-35, 其全部内容通过引用并入本文)。

[0206] 在生物淘选程序中在涂覆的huApoC3上, 或者用在涂覆的链霉亲和素上捕获的生物素化ApoC3, 选择噬菌体展示文库。在pH 5.5下洗脱噬菌体以选择在酸性条件下丧失对huApoC3的亲亲和性的抗体克隆体。在3轮选择后, 制备单集落并进行如实施例2所述的抗体筛选。

[0207] 实施例2: 筛选抗ApoC3单克隆抗体

[0208] 本实施例描述了筛选实施例1中制备的scFv噬菌体展示文库中与ApoC3结合的抗体。采用两种基于ELISA的筛选方法, 一种是用直接涂覆在板上的纯化的ApoC3, 另一种是用由涂覆在板上的链霉亲和素捕获的生物素化ApoC3。每种方法都揭示了许多对ApoC3具有亲和力的抗体克隆体。从这两种测定鉴定的克隆体之间存在显著重叠, 而差异可能反映了两种条件下ApoC3蛋白构象和表位暴露的不同。

[0209] 2.1分析对于直接涂覆的ApoC3的亲合力

[0210] 通过ELISA测定采用直接涂覆在板上的纯化huApoC3 (Athens Research and Technology) 分析选自实施例1中构建的scFv噬菌体展示文库的抗体克隆体。将在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中稀释的浓度为1-10 μ g/ml (100 μ l/孔) 的人天然ApoC3在Microtiter Immunoassay Maxisorp 96孔板 (NUNC目录号456537或类似物) 中于4 $^{\circ}$ C下温育过夜。将涂覆的板用含有0.05% (v/v) 的Tween-20的250 μ l/孔PBS (PBS-T) 洗涤三次, 以除去过量的未结合的抗原。洗涤后, 将250 μ l在PBS中制备的4% (m/v) 干燥脱脂乳溶液加至每个涂覆的孔中用于封闭, 并将板在室温下在平板振荡器 (TitraMax 1000或Heidolph) 上温育1至2小时。封闭后, 将板洗涤三次以用250 μ l/孔PBS-T除去过量的封闭溶液。将来自粗周质提取物 (P.E.) 的抗体片段 (scFv) (在PBS中1:5稀释至终体积100 μ l) 在平板振荡器上在室温下与固定化抗原结合1小时。P.E. 中未结合的可溶性scFv通过用250 μ l/孔PBS-T洗涤板5次而除去。为了检测, 以1% (m/v) 干燥脱脂乳溶液中1:5000稀释度使用识别与scFv抗体片段的C末端融合的c-myc标签的每孔100 μ l的抗c-myc辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的单克隆抗体 (Bethyl; 目录号: A190-105P或类似物)。在室温下温育1小时后, 用250 μ l/孔PBS-T连续洗涤板3次, 并用250 μ l/孔PBS连续洗涤板3次。分光光度检测用于监测由HRP酶缀合物催化的3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, eBioscience, 目录号: 00-4201-56) 的氧化。每孔加入100 μ l 0.5M H₂SO₄以

停止反应。使用Microplate分光光度计在450nm下测量终产物的吸光度。基于与接受空白P.E.的对照孔相比的吸光度值确定结合特异性。

[0211] 鉴定出30种抗体对huApoC3具有亲和力。产生最强信号的克隆体是8B4,8A4,8H4,1D5,12E12,6A6,10B6,4H1,5A7,8F4,5C11,7D9,5A8,9A4,4C2,5A4,12C3和5E5。这些克隆体中的一些的VH和VL的序列列于表1-4中。

[0212] 2.2分析对于捕获的生物素化ApoC3的亲和力

[0213] 通过ELISA测定采用由涂覆在板上的链霉亲和素捕获的生物素化ApoC3分析选自实施例1中构建的scFv噬菌体展示文库的抗体克隆体。将在PBS (pH 7.4) 中以2-5 μ g/ml (100 μ l/孔) 的浓度稀释的中性抗生物素蛋白 (Fisher Scientific LDA目录号:W9995L) 在Microtiter Immunoassay Maxisorp 96孔板 (NUNC目录号456537或类似物) 中于4 $^{\circ}$ C下温育过夜。将涂覆的板用250 μ l/孔PBS-T洗涤三次以除去过量的未结合的中性抗生物素蛋白。洗涤后,将250 μ l在PBS中制备的1% (m/v) 酪蛋白溶液加至每个涂覆的孔中用于封闭,并将板在室温下在平板振荡器 (TitraMax 1000, Heidolph或类似物) 上温育1至2小时。封闭后,将板洗涤三次以用250 μ l/孔PBS-T除去过量的封闭溶液。在人天然ApoC3蛋白 (Athens Research and Technology) 的随机位点引入生物素基团。将在PBS中的0.1% (m/v) 酪蛋白中以1至5nM (100 μ l/孔) 的浓度稀释的生物素化ApoC3在涂覆和封闭的板中在室温下温育1小时以捕获ApoC3抗原。通过用250 μ l/孔PBS-T洗涤板5次而除去未结合的抗原。将来自粗P.E.的抗体片段 (scFv) (在PBS中1:5稀释至终体积100 μ l) 在1小时温育期间在室温下与捕获的抗原结合。未结合的可溶性scFv片段通过用250 μ l/孔PBS-T洗涤板5次而除去。为了检测,以1% (m/v) 干燥脱脂乳溶液中1:5000稀释度使用识别与scFv抗体片段的C末端融合的c-myc标签的每孔100 μ l的抗c-myc辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的单克隆抗体 (Bethyl; 目录号:A190-105P或类似物)。在室温下温育1小时后,用250 μ l/孔PBS-T连续洗涤板3次,并用250 μ l/孔PBS连续洗涤板3次。分光光度检测用于监测由HRP酶缀合物催化的TMB的氧化。每孔加入100 μ l 0.5M H₂SO₄以停止反应。使用Microplate分光光度计在450nm下测量终产物的吸光度。基于与接受空白P.E.的对照孔相比的吸光度值确定结合特异性。

[0214] 鉴定出17种抗体对huApoC3具有亲和力。在450nm处产生最强吸光度的克隆体是12E12,12C3,13C10,13G7,12G8,14C4,13F2,13C7,14G4,12D7,14C7,12A3和12E3。这些克隆中的一些的VH和VL的序列列于表1-4中。

[0215] 2.3Biacore SPR测定

[0216] 本实施例描述使用Biacore 3000仪器 (Biacore AB) 使用基于SPR的测定法表征抗ApoC3抗体在中性条件下对ApoC3的亲和力。将天然huApoC3蛋白固定在CM5芯片上。根据Biacore提供的方法使用NHS/EDC试剂盒 (Biacore AB) 进行固定:在芯片活化后,制备60 μ g/ml的人ApoC3在pH为4.5的10mM乙酸盐缓冲液中的溶液并注入,直至表面密度达到约1000RU。根据Biacore提供的方法,通过注射20 μ l 10 μ g/ml生物素化人ApoC3,从而达到约500RU的表面密度,在pH 7.4下在链霉亲和素涂覆的芯片 (SA) 上捕获人ApoC3。将在HBS-EP缓冲液 (GE, 目录号BR-1008-26; 0.010M HEPES, 0.150M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% (v/v) 表面活性剂P20, pH 7.4) 中稀释的1-100nM范围内的60 μ l测试抗体注入并以30 μ l/min的流速通过流动池,然后在pH 7.4或pH 5.5下进行解离速率洗涤 (off-rate wash) 5分钟。解离后,通过在pH 1.5下注射10 μ l 10mM NaOH/1M NaCl和10 μ l 10mM甘氨酸来再生流动池表面。使用

BIAevaluation 4.1软件使用Langmuir 1:1结合模型分析所得的传感图以得到结合动力学。数据进行零位调整并减去参考细胞传感图。

[0217] 在该测定中检查了许多scFv-Fc抗体。表5中显示了这些抗体的结合速率(k_a)、解离速率(k_d)、分析物结合能力(R_{max})、平衡缔合常数(K_A)和平衡解离常数(K_D)。

[0218] 表5.Biacore亲和力测量结果

[0219]

克隆体ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	R_{max} (RU)	K_A (1/M)	K_D (M)
1D5	1.15E+06	3.34E-04	2130	3.43E+09	2.91E-10
1G4	5.82E+05	0.0115	694	5.07E+07	1.97E-08
4C2	2.06E+05	2.55E-04	2450	8.07E+08	1.24E-09
4H1	3.91E+05	1.03E-04	2320	3.80E+09	2.63E-10
5A4	1.06E+06	3.51E-04	1260	3.02E+09	3.31E-10
5A7	1.35E+06	6.47E-04	460	2.08E+09	4.80E-10
5A11	1.44E+06	6.68E-04	412	2.15E+09	4.65E-10
5C11	7.39E+04	7.82E-04	429	9.44E+07	1.06E-08
5E5	2.60E+05	4.37E-04	764	5.94E+08	1.68E-09
5E7	5.16E+05	9.16E-04	204	5.63E+08	1.78E-09
6A6	1.19E+06	1.86E-04	1140	6.41E+09	1.56E-10
7A9	2.59E+06	6.70E-04	516	3.87E+09	2.58E-10
7D9	5.99E+04	9.64E-04	230	6.21E+07	1.61E-08
8A4	3.00E+05	7.02E-05	581	4.27E+09	2.34E-10
8B7	2.81E+06	6.75E-04	516	4.16E+09	2.40E-10
8F4	1.63E+05	9.44E-05	811	1.72E+09	5.81E-10
8H4	1.87E+05	7.44E-05	1030	2.52E+09	3.97E-10
10B6	1.71E+05	6.64E-05	620	2.58E+09	3.88E-10
11H1	1.22E+05	2.07E-04	935	5.89E+08	1.70E-09
14C7*	8.20E+04	5.61E-05	358	1.46E+09	6.84E-10

[0220] *以IgG1形式检查此克隆体。

[0221] 实施例3:脂质竞争测定

[0222] 本实施例描述了抗ApoC3抗体关于它们是否与脂质竞争结合ApoC3的表征。首先进行基于ELISA的测定以鉴定消除或不消除脂质结合的抗体。为了进一步验证结果,然后用某些克隆体进行基于表面等离子体共振 (SPR) 的测定。

[0223] 3.1基于ELISA的测定

[0224] 进行基于ELISA的脂质竞争测定以确定从实施例2鉴定的抗ApoC3抗体是否干扰huApoC3蛋白与固定在ELISA板上的脂质之间的相互作用。简言之,在甲醇:氯仿:水(2.0:1.0:0.8)的混合物中稀释1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(Avanti Polar Lipids DMPC;14:0PC)在氯仿中的储备溶液。将5 μ g DMPC分配到Greiner U-底高结合板(#850345)的每个孔中,并使氯仿、甲醇和水溶剂在室温下蒸发最少3小时。将孔在200 μ L缓冲液中封闭,所述缓冲液由在4 $^{\circ}$ C下过夜溶解在PBS中的无脂奶粉组成(在本文中称为“清乳PBS”)。将

每种测试抗体与从人血清纯化的天然ApoC3蛋白 (Athens Research and Technology) 混合。将50 μ L混合溶液分配到涂有DMPC的微量滴定板中,并将板在室温下以300rpm旋转2小时。将板用200 μ L PBS洗涤4次。加入溶于清乳PBS中的50 μ L生物素化抗ApoC3多克隆山羊抗体 (Abcam#ab21024),并将板在室温下以300rpm旋转1小时。将板用200 μ L PBS洗涤一次,并加入50 μ L链霉亲和素-HRP溶液 (Abcam#34028;在PBS中稀释100倍)。将板在室温下以300rpm旋转30分钟。将孔用200 μ L PBS洗涤4次。加入80 μ L TMB ELISA显色试剂 (Thermo Ultra-TMB ELISA#34028),显色后用50 μ L 0.5N HCL停止显色反应。读取450nm处的吸光度,并使用4-参数逻辑函数 (GraphPad Prism 6) 分析数据。

[0225] 如图1中所示,克隆体12C12,12D7,12G8,13G7,14C4和14C7抑制脂质与huApoC3的结合,而克隆体12A3,12C3,12D1,12D4,12E12,13C7,13C10,13F2,14F2和14G4未抑制。

[0226] 3.2基于SPR的VLDL结合测定

[0227] 进行基于SPR的脂质竞争测定以确认选择的抗ApoC3抗体,即scFv-Fc形式的14C7、5E5和6A6,是否与脂质竞争ApoC3结合。如Mendoza-Barbera及同事所述 (Mendoza-Barbera等, J Lipid Res 2013),将VLDL脂质体固定在L1传感器芯片 (Biacore,Uppsala,Sweden) 上。如图2的A部分所示,在 $t=1800$ s时以10 μ L/min流速注射10 μ g/ml ApoC3,与注射缓冲液或14C7mAb的阴性对照相比,产生增加的结合信号,表明ApoC3掺入固定的VLDL脂质体中。在 $t=2100$ s时注射缓冲液导致信号减少,但与阴性对照相比,信号保持在基线之上,表明ApoC3掺入VLDL脂质体中。相比之下,当在 $t=1800$ s时注射预温育的10 μ g/ml ApoC3和10 μ g/ml 14C7抗体的混合物 (表示为“14C7+”)时,观察到结合信号的初始增加,但是在 $t=2100$ s时的缓冲液注射时,响应返回至关于阴性对照的背景水平,表明14C7干扰ApoC3和脂质之间的稳定相互作用。

[0228] 在该基于SPR的测定系统中还检查了5E5和6A6,其在ELISA测定中不与脂质竞争结合ApoC3。如图2的B部分所示,在5E5或6A6存在下的ApoC3注射导致结合信号的增加,并且在 $t=2100$ s时的缓冲液注射时结合信号保持强于单独ApoC3的信号。此结果表明ApoC3-5E5或ApoC3-6A6复合物通过与ApoC3-VLDL的相互作用而留在传感器芯片上。因此,5E5和6A6不竞争ApoC3与脂质的结合。没有ApoC3的单独的5E5或6A6的对照样品不与测试表面结合。

[0229] 3.3基于SPR的脂质体结合测定

[0230] 进行第二次基于SPR的脂质竞争测定以确认IgG1形式的14C7、5E5和6A6抗体是否与脂质竞争ApoC3结合。简言之,通过将约5mg DMPC (Sigma) 溶解在玻璃小瓶中的氯仿中以达到100mg/ml的浓度来制备DMPC脂质体。将玻璃小瓶置于真空下3小时以除去氯仿,从而使DMPC形成脂质膜。将1ml重悬浮缓冲液 (20mM Tris-HCl,140mM NaCl,pH 7.4) 加至脂质膜中并剧烈涡旋直至从壁上除去膜。在6次冷冻融化循环 (在液氮中) 后,将悬浮液通过100nm聚碳酸酯膜挤出30次以形成脂质体。将脂质体在HBS-N缓冲液中1:10稀释。通过以10 μ L/min注射10 μ L的100mM NaOH,然后以150 μ L/min注射300 μ L的HBS-N缓冲液来活化L1传感器芯片。以2 μ L/min注射20 μ L脂质体以固定在活化的芯片表面上。随后,注射20 μ L的100mM NaOH,然后注射10 μ L的100 μ g/ml BSA。在用HBS-N缓冲液洗涤表面后,在 $t=1800$ s时注射天然人ApoC3蛋白以形成脂质体-ApoC3复合物。然后在 $t=4400$ s时注射14C7、5E5和6A6抗体。

[0231] 如图2的C部分中所示,在注射5E5和6A6抗体时检测到更大的复合物,表明这两种抗体能够结合脂质结合的ApoC3。5E5和6A6抗体在其中ApoA1代替ApoC3的对照组中不产生

信号(数据未示出),表明它们不单独与ApoA1或DMPC脂质体结合。

[0232] 实施例4:ApoC3介导的脂蛋白脂酶(LPL)抑制测定

[0233] 4.1 LPL活性的调制的分析

[0234] 本实施例描述了抗ApoC3抗体关于其减弱ApoC3介导的LPL抑制的能力的表征。将14C7,13G7,5E5和6A6抗体格式重设为IgG1形式,并在体外LPL活性测定中检查。14C7和13G7减弱ApoC3介导的LPL抑制,并以剂量依赖性方式显著增加LPL活性(图3)。14C7和13G7的EC50值分别为约2 μ M和3 μ M。对于具有大于5 μ M的EC50值的5E5或6A6抗体,这样的减弱较弱且较不显著。

[0235] 4.2材料和方法

[0236] 将20% Intralipid乳剂(Santa Cruz Biotechnology;SC-215182)通过用50mM TRIS-HCl pH 8.0缓冲液在10 $^{\circ}$ C下在15,000xg下浮选15min而洗涤3次,以除去过量的磷脂和其它更小的脂质颗粒。在洗涤过程结束时,估计Intralipid为10%。将Intralipid稀释100倍至由50mM TRIS-HCl pH 8.0,150mM NaCl,2%BSA,15单位/mL肝素组成的测定缓冲液中。通过加入20 μ L含有测试抗体的Intralipid,20 μ L的在测定缓冲液中的从人血清中纯化的天然ApoC3蛋白(Athens Research and Technology),和20 μ L的从牛奶中分离的在测定缓冲液中的LPL,而在V形底聚丙烯板(Falcon#353263)中装配该测定。测定缓冲液中的Intralipid、ApoC3蛋白和LPL的最终浓度分别为0.1%、1.5 μ M和30nM。使测定在30 $^{\circ}$ C下进行30分钟,并通过添加补充有20 μ M奥利司他(Orlistate)的100 μ L Wako NEFA试剂A(999-34691;995-34791)而终止。在30 $^{\circ}$ C下20分钟后,加入补充有200 μ M Amplex Red(AAT Bioquest)的50 μ L Wako NEFA试剂B(991-34891;993-35191),并将板在30 $^{\circ}$ C下温育20分钟。将120 μ L等分试样转移至黑色96孔板(Costar#3915),并在激发560nm/发射585nm下读取荧光。使用4-参数逻辑函数(GraphPad Prism 6)分析数据。

[0237] 实施例5:肝细胞VLDL摄取测定

[0238] 5.1肝细胞VLDL摄取的分析

[0239] 本实施例描述了抗ApoC3抗体关于其逆转ApoC3对肝细胞VLDL摄取的抑制的能力的表征。如图4中所示,克隆体5A4,5A7,5A11,5E5,6A6,7A9,8A4,8B4,8B7,8F4,8H4,10B6,12A3,12C3,12C12,12D1,12D4,12E12,13C7,13G7,14C4,14C7和14G4增加HepG2细胞的VLDL摄取。ApoC3抑制VLDL摄取的能力的减弱可从图4中的值所量化。标记为“ApoC3”的第一条柱表示在添加至肝细胞培养物中的纯化ApoC3的情况下VLDL摄取的水平。标记为“对照”的第二条柱表示在不存在外源ApoC3的情况下肝细胞培养物中VLDL摄取的水平。将第一条柱的值作为0%抑制并将第二条柱的值作为100%抑制,5A4,5A7,5A11,5E5,6A6,7A9,8A4,8B4,8B7,8F4,8H4,10B6,12A3,12C3,12C12,12D1,12D4,12E12,13C7,13G7,14C4,14C7和14G4减弱ApoC3抑制VLDL摄取的能力分别为约100%,50%,55%,100%,75%,50%,40%,60%,40%,75%,70%,70%,100%,85%,100%,60%,60%,40%,95%,100%,60%,100%和100%(图4,A部分)。5A7,7A9和8B7具有相同的VH和VL序列。克隆体1D5,1D8,1G4,4C2,4H1,5A8,5E7,7D9和13C10未减弱ApoC3抑制HepG2细胞摄取VLDL的能力(图4,B部分)。

[0240] 5.2材料和方法

[0241] 将HepG2细胞(ATCC HB-8065)接种在补充有10%FCS(Seradigm)的100 μ L完全MEM(Life Technologies)中的聚-d-赖氨酸涂覆的96孔组织培养板(Greiner Bio-One#

655940) 上,并在37℃,5%CO₂下培养。24小时后,除去培养基,并用补充有0.0125%牛血清白蛋白(Roche)的200μL完全MEM洗涤细胞单层一次。加入100μL补充有0.0125%牛血清白蛋白的完全MEM的新鲜培养基。再过24小时后,除去培养基并用补充有0.0125%BSA的、含有MEM中的3μM ApoC3(Athens Research and Technology)和1.5至4μM测试抗体(scFv-Fc形式)的50μL测试混合物替换。在37℃下温育15分钟后,将30μg/mL ApoC3耗尽的DiI VLDL(Kalen Biomedical,LLC#770130-9)加至测试混合物。温育4小时后,除去测试混合物,并将细胞与在完全MEM中稀释的100μL1%Intralipid一起温育20分钟,37℃,5%CO₂。除去培养基,用200μL 37℃ DPBS(Life Technologies 14190-144)洗涤细胞三次。洗涤后,向各孔中加入100μL异丙醇,并将板在室温下伴随轻轻摇动温育15分钟。将75μL等分试样转移至黑色96孔板(VWR89089-582)并测量荧光(激发=520nm;发射=580nm)。从DiI-VLDL标准曲线确定从每单位体积异丙醇的细胞中提取的DiI-VLDL的量。从细胞板中除去剩余的异丙醇,并向每个孔中加入100μL裂解缓冲液(0.1N NaOH,0.1%SDS)。温育最少30分钟后,使用25μL等分试样定量蛋白质(Pierce BCA Protein Assay;Thermo Scientific#23225)。将VLDL摄入到细胞中的量计算为DiI-VLDL与蛋白质质量的比率。使用GraphPad Prism 6绘制数据并报告为平均值+/-SEM。使用GraphPad Prism 6计算具有多重比较的单因素方差分析。

[0242] 实施例6:跨物种反应性测定

[0243] 本实施例描述了使用基于Biacore的测定表征抗ApoC3抗体关于其与食蟹猕猴(食蟹猴)ApoC3(cynoApoC3)蛋白交叉反应的能力。如图5中所示,IgG1形式的14C7(A部分),5A7(B部分),5E5(C部分)和6A6(D部分)都能够与cynoApoC3结合,尽管它们对cynoApoC3的亲合力低于它们对huApoC3的亲合力。

[0244] 使用Biacore 3000仪器(GE Healthcare)进行SPR实验。使用胺偶联化学将CM5传感器芯片的流动池与产生的14C7,5A7,5E5和6A6的IgG形式化的抗体(~2000RU)偶联。使用在pH 5.0的10mM乙酸钠缓冲液中的10μg/ml抗体溶液,使用针对2000RU作为涂覆密度的适应性固定化Biacore方案进行偶联。对于所有实验,将pH 7.4的HBS-EP缓冲液用作运行和稀释缓冲液。将60μl浓度范围为10至200μg/ml的人天然ApoC3或食蟹猴天然ApoC3蛋白制备物注射到所有流动通道上,然后在pH 7.4下进行解离速率洗涤5分钟。所有注射均在25℃下以30μl/min的恒定流速进行。解离后,通过在pH 1.5下注射10μl 10mM NaOH/1M NaCl和10μl 110mM甘氨酸来再生流动池表面。空白通道扣除后所得的传感图用于确认跨物种反应性和评估亲合力。

[0245] 实施例7:抗ApoC3抗体5E5,6A6和14C7的表位绘图

[0246] 7.1 5E5,6A6和14C7的表位扫描

[0247] 本实施例描述了5E5,6A6和14C7抗体的表位扫描。将美洲驼抗体5E5与ApoC3肽微阵列以1μg/ml的浓度温育,并用二级和对照抗体染色微阵列。在7/7(红色/绿色)扫描强度下的读出表现出非常好的信噪比,显示出强烈且清晰的单克隆响应,其具有由相邻的10个氨基酸和13个氨基酸的肽形成的两个表位样斑点图案,共有基序为FSEFWDLDP(E SEQ ID NO:3)(图6,A部分)。

[0248] 将美洲驼抗体6A6与ApoC3肽微阵列以0.2μg/ml的浓度温育,并用二级和对照抗体染色微阵列。在7/7(红色/绿色)扫描强度下的读出表现出非常好的信噪比,显示出强烈且清晰的单克隆响应,其具有由相邻的10个氨基酸和13个氨基酸的肽形成的两个表位样斑点

图案,共有基序为FSEFWDLDP E (SEQ ID NO:3) (图6,B部分)。

[0249] 将美洲驼抗体14C7与ApoC3肽微阵列以1 μ g/ml和10 μ g/ml的浓度温育,并用二级和对照抗体染色微阵列。在7/7 (红色/绿色) 扫描强度下的读出表现出良好的信噪比,显示出清晰的单克隆反应,其具有由相邻的13个氨基酸的肽形成的单一表位样斑点图案,共有基序为GWVTDGFSSLK (SEQ ID NO:2) (图5,C部分)。

[0250] 7.2 5E5,6A6和14C7的表位置换扫描

[0251] 通过置换扫描进一步分析共有基序FSEFWDLDP E (SEQ ID NO:3) 以鉴定对表位与5E5或6A6抗体之间的相互作用关键的氨基酸残基。合成了13个氨基酸的环状约束肽的阵列。在阵列的每一行中,肽DKFSEFWDLDP EV (SEQ ID NO:44) 中的单个氨基酸残基被置换,其中置换残基由阵列的列表示。

[0252] 如表6 (亲和力表示为与野生型ApoC3肽 (SEQ ID NO:44) 的结合的百分比) 和置换矩阵 (图7,A部分) 中所示,5E5与置换阵列的结合证明成熟huApoC3 (SEQ ID NO:1) 的W65和D66对于mAb 5E5的结合是必要的,并且不容忍任何其他氨基酸的交换。成熟huApoC3的S62和D68也是高度保守的;用A或V置换S62,用E或P置换D68,导致斑点强度降低约60%或更高。然而,通过T保守置换S62导致斑点强度加倍。氨基酸L67和P69是中度保守的;用T或V置换L67,以及用T或S置换P69是良好容忍的,而用其他氨基酸交换导致约50%的结合损失。氨基酸位置F61和E63较不保守,但显示出对野生型和少量附加氨基酸 (F61位置处的E和Y;E63位置处的Y、P和A) 的明显偏好;其他氨基酸的交换仅引起斑点强度的轻微下降。氨基酸F64完全可变。可变氨基酸位置D59和E70显然也显示出对野生型氨基酸的偏好,对酸性氨基酸D和E具有一般且较不特异的偏好。

表 6. 5E5 与经置换的 ApoC3 肽的亲合力。

	D59	K60	F61	S62	E63	F64	W65	D66	L67	D68	P69	E70	V71
A	44.36	142.68	17.35	29.61	90.12	219.99	0.00	0.00	20.96	1.75	25.71	50.04	66.34
C	66.24	67.18	0.51	0.00	2.30	51.03	0.08	10.27	0.00	5.46	3.72	27.08	56.91
D	100.00	199.95	16.01	0.00	29.94	258.78	0.00	100.00	0.99	100.00	21.62	82.92	110.84
E	128.19	361.70	180.25	0.00	100.00	283.41	0.00	2.16	0.45	40.07	42.97	100.00	127.12
F	31.59	53.25	100.00	1.25	57.12	100.00	5.50	0.00	0.37	0.00	11.63	40.09	81.43
G	60.33	143.08	0.74	0.88	0.00	211.95	0.00	0.00	35.18	3.59	24.56	46.13	91.93
H	52.80	115.74	12.10	2.89	49.85	84.52	0.00	0.00	3.58	0.00	10.73	50.47	72.83
I	49.14	106.26	7.59	0.64	0.00	69.31	0.00	0.00	46.93	0.00	47.99	65.59	65.98
K	30.63	100.00	13.47	4.05	19.07	114.15	0.00	0.00	45.62	0.04	20.69	60.06	91.12
L	33.57	106.86	63.39	3.83	10.08	117.68	0.00	0.00	100.00	0.00	16.68	59.08	90.56
M	57.71	186.18	68.73	0.00	13.13	131.99	0.00	0.00	12.49	2.82	29.30	73.96	137.79
N	52.50	152.77	25.92	0.00	31.26	233.78	0.00	0.00	9.84	0.00	19.45	49.61	86.62
P	69.26	205.07	52.72	0.00	81.16	527.81	0.00	0.00	25.48	28.58	100.00	55.17	173.42
Q	68.34	178.48	75.61	1.13	32.38	129.80	0.00	0.00	3.99	0.96	24.26	67.97	86.76
R	43.33	111.73	2.77	1.45	2.19	73.66	0.02	0.17	15.39	0.00	20.11	35.75	57.33
S	57.72	173.90	22.57	100.00	47.86	366.80	0.00	0.00	36.52	0.17	86.87	55.24	74.14
T	94.94	177.11	40.34	215.08	0.00	467.47	0.00	0.00	167.80	0.65	113.22	83.00	96.74
V	43.34	100.56	20.16	30.48	4.20	116.72	17.87	0.00	84.76	0.00	55.17	57.01	100.00
W	56.76	41.90	15.66	0.00	9.57	88.50	100.00	0.00	1.45	0.00	5.36	35.41	68.72
Y	50.27	56.30	126.40	0.00	90.93	117.64	0.00	0.00	0.02	0.16	15.36	50.73	87.43

第一行表示野生型 ApoC3 肽中的氨基酸位置。第一列表示具体的氨基酸置换。

[0253]

[0254] 如表7 (亲和力表示为与野生型ApoC3肽 (SEQ ID NO:44) 的结合的百分比) 和置换矩阵 (图7, B部分) 中所示, 6A6与置换阵列的结合证明成熟huApoC3 (SEQ ID NO:1) 的E70对于mAb 6A6的结合是必要的, 并且不容忍任何其他氨基酸的交换。成熟huApoC3的D66和D68也是高度保守的; E的保守交换导致D66位置处斑点强度降低80%, D68位置处斑点强度降低44%, 并且其他氨基酸的替代没有被容忍而不完全损失抗体结合。L67是良好保守的; I或T

的置换不影响抗体结合,但V或M的交换导致斑点强度降低约50%。E63是中度保守的,但对D的保守交换敏感;用P替代甚至导致约1.5倍更高的斑点强度,可能是由于倍叠效应。W65也是中度保守的,但E,S,D和T的交换导致斑点强度增加;然而,用其他氨基酸置换导致抗体结合降低至少45%。F61显示出对野生型氨基酸或对Y的保守交换的明显偏好,但通常较不保守并且对所有其他氨基酸的交换敏感而不完全丧失与6A6的结合。S62和P69显示出对野生型氨基酸的某种偏好,但是两个位置都保守性差且容忍许多置换而对抗体结合没有任何影响。F64完全可变。所有其他可变位置显示出对酸性氨基酸D和E的明显偏好,可能是由于离子效应。

表 7. 6A6 与经置换的 ApoC3 肽的亲合力。

	D59	K60	F61	S62	E63	F64	W65	D66	L67	D68	P69	E70	V71
A	86.42	120.42	41.07	97.31	36.70	166.36	26.37	0.00	9.07	0.00	57.43	0.97	85.16
C	69.18	84.04	20.64	10.45	7.93	76.38	15.99	7.92	1.13	5.29	28.92	0.00	100.20
D	100.00	151.10	31.34	35.05	77.88	220.13	130.06	100.00	2.89	100.00	98.51	13.78	222.56
E	169.54	223.26	83.88	70.74	100.00	235.56	167.67	18.86	8.52	56.90	151.65	100.00	228.42
F	61.50	83.73	100.00	9.54	8.50	100.00	55.34	7.27	26.29	0.00	97.69	9.36	85.38
G	87.48	117.46	25.88	53.92	20.48	167.99	49.49	0.00	0.60	0.00	16.27	1.26	108.64
H	85.76	123.61	44.18	26.51	12.26	107.29	16.96	0.00	7.67	0.00	19.23	0.03	75.94
I	103.39	115.95	44.31	129.44	8.76	100.39	20.29	0.00	104.67	0.00	81.94	1.59	54.32
K	45.57	100.00	37.16	11.07	7.90	106.94	0.00	0.33	25.80	0.00	26.30	0.00	58.74
L	68.63	89.25	61.30	80.96	10.10	89.71	18.53	0.00	100.00	0.00	36.83	1.22	78.04
M	60.17	146.27	56.46	63.50	43.49	108.51	19.08	0.08	43.42	0.00	44.15	2.34	105.37
N	77.45	138.61	48.34	126.44	38.79	153.14	56.52	0.00	19.80	0.00	32.68	0.15	98.65
P	107.23	156.71	78.97	27.06	138.15	285.04	13.81	0.00	0.00	0.00	100.00	2.53	109.50
Q	95.04	139.83	64.50	110.76	46.31	133.47	38.33	0.00	25.68	0.00	28.19	2.10	81.39
R	70.18	105.31	35.63	37.21	5.31	79.08	7.71	0.00	22.62	0.66	17.43	0.00	47.50
S	87.47	155.61	39.23	100.00	35.22	196.16	131.50	0.00	26.51	0.57	75.63	1.05	84.72
T	101.48	148.75	56.29	138.96	35.92	214.93	104.59	0.00	100.22	0.69	118.29	1.55	94.50
V	65.08	106.12	46.96	93.60	12.98	85.96	23.96	0.00	56.47	0.00	68.32	0.27	100.00
W	78.11	78.57	32.94	4.78	1.91	69.55	100.00	0.00	1.26	0.00	13.69	2.84	59.19
Y	70.25	83.93	111.68	16.34	8.92	86.37	26.68	0.00	3.08	0.00	51.99	4.49	87.28

第一行表示野生型 ApoC3 肽中的氨基酸位置。第一列表示具体的氨基酸置换。

[0255]

[0256] 通过置换扫描进一步分析共有基序GWVTDGFSSLK (SEQ ID NO:2) 以鉴定对表位和 14C7 抗体之间的相互作用关键的氨基酸残基。合成了 13 个氨基酸的环状约束肽的阵列。在阵列的每一行中,肽ARGWVTDGFSSLK (SEQ ID NO:45) 中的单个氨基酸残基被置换,其中置换残基由阵列的列表示。

[0257] 如表 8 (亲和力表示为与野生型 ApoC3 肽 (SEQ ID NO:45) 的结合的百分比) 和置换矩阵 (图 7, C 部分) 中所示, 14C7 与置换阵列的结合证明成熟 huApoC3 (SEQ ID NO:1) 的 T44 和 S49 对于 mAb 14C7 的结合是必要的, 并且不容忍任何其他氨基酸的交换而不完全或几乎完全丧失结合。氨基酸 G41 和 G46 高度保守; 用 E, N 或 Q 置换 G41 导致斑点强度降低约 70% 或更高, 而 N 交换 G46 是几乎不可容忍的并且导致斑点强度降低 90%。氨基酸位置 F47 和 L50 也表现出高度的序列保守性, 并且仅容忍 Y (F47) 或其他疏水性氨基酸 F 和 W (L50) 的保守交换, 斑点强度显著降低。氨基酸位置 V43, D45 和 K51 也是良好保守的, 对野生型氨基酸具有明显的偏好, 特别是对通过 Y, F 和 I (V43), A, E 和 K (D45) 以及 R (K51) 的保守交换具有一定的容忍性。这些交换导致斑点强度降低 30-55%, 而其他氨基酸交换较不容忍。然而, 用 Y 代替 V43 使斑点强度增加了两倍。氨基酸位置 W42 和 S48 保守性差或甚至可变; 两个位置仅对一些氨基酸交换敏感, 并且 F, S 和 T (W42) 或 E (S48) 的交换甚至导致斑点强度增加 2 至 3 倍。氨基酸位置 A39 和 R40 是可变的。

表 8.14C7 与经置换的 ApoC3 肽的亲合力。

	A39	R40	G41	W42	V43	T44	D45	G46	F47	S48	S49	L50	K51
A	100.00	50.10	7.01	115.70	26.94	0.00	45.32	0.00	0.00	75.52	2.43	0.00	10.11
C	77.46	62.28	14.80	61.60	0.12	0.00	11.20	0.00	0.00	56.82	0.00	0.00	0.00
D	50.69	50.01	19.41	107.64	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	71.57	0.00	0.00	0.00
E	98.90	76.88	28.05	98.45	0.00	0.00	40.01	0.00	0.00	289.91	0.00	0.00	4.71
F	78.21	70.80	10.77	242.46	68.89	0.00	0.00	0.86	100.00	9.29	0.89	56.65	6.24
G	93.02	62.85	100.00	106.74	0.12	0.00	2.16	100.00	0.00	3.70	0.00	0.00	5.77
H	69.42	44.42	23.13	48.59	14.62	0.92	1.81	1.81	0.00	11.48	0.56	0.00	2.43
I	52.30	35.10	5.33	27.89	40.98	1.86	2.04	0.00	0.00	23.58	0.00	9.47	0.86
K	72.94	58.06	18.04	136.36	25.45	0.00	39.42	0.24	0.12	89.99	3.23	0.74	100.00
L	77.46	54.20	6.27	312.13	429.39	0.50	17.10	0.00	4.56	19.65	0.00	100.00	0.33
M	90.65	69.57	18.67	79.42	20.86	0.00	21.03	0.00	0.00	121.16	1.86	0.65	11.07
N	103.16	64.79	27.49	117.91	1.36	2.49	4.85	10.45	0.06	48.49	0.00	0.00	2.60
P	165.66	52.67	8.70	18.61	1.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.24
Q	103.54	85.76	27.11	93.13	7.49	0.00	21.01	0.00	0.00	46.80	0.33	0.12	5.47
R	89.37	100.00	19.38	140.98	15.12	0.00	20.09	0.30	0.00	34.50	0.74	0.00	57.41
S	81.39	54.67	18.70	204.26	1.54	1.12	20.83	0.00	0.00	100.00	100.00	0.00	27.46
T	88.69	38.69	9.44	185.67	9.94	100.00	8.67	0.00	0.00	88.35	6.21	0.00	17.46
V	75.95	57.50	8.76	48.29	100.00	4.26	1.21	0.00	0.06	45.32	0.59	0.74	3.85
W	59.38	38.82	17.71	100.00	8.98	0.00	0.06	0.00	1.57	3.49	0.27	17.73	0.00
Y	40.48	37.52	6.27	148.73	230.30	0.00	0.00	0.00	67.71	5.83	0.00	0.38	0.00

第一行表示野生型 ApoC3 肽中的氨基酸位置。第一列表示具体的氨基酸置换。

[0258]

[0259] 7.3材料和方法

[0260] 通过在C-和N-末端处的中性GSGSGSG (SEQ ID NO:46) 接头延长ApoC3的序列以避

免截短的肽。延长的序列被翻译成7、10和13个氨基酸的肽，肽-肽重叠6、9和12个氨基酸。在通过Pepperchip®平台进行肽合成后，通过C-末端半胱氨酸侧链硫醇基团和适当修饰的N-末端之间的硫醚键环化所有肽。得到的环状ApoC3肽微阵列含有252个不同的环状约束肽，一式两份打印（504个肽点），并用另外的HA对照肽（YPYDVDPYAG（SEQ ID NO:112），80个点）构建。

[0261] 在洗涤缓冲液中预溶胀15分钟和在封闭缓冲液中预溶胀30分钟后，首先将ApoC3肽微阵列拷贝之一与第二抗体山羊抗人IgG（Fc）DyLight680以1:5000的稀释度在室温下一起温育45分钟，和与对照抗体小鼠单克隆抗HA（12CA5）DyLight800以1:2000稀释度在室温下一起温育45分钟，以分析与抗原衍生肽的背景相互作用。在7/7（红色/绿色）的扫描强度下，即使在亮度和对比度显著增加后，我们也未观察到第二和对照抗体两者与ApoC3肽的任何背景相互作用（参见调整的扫描）。小鼠单克隆抗HA（12CA5）DyLight800对照抗体产生预期的明确定义的HA对照斑点图案（其构成肽微阵列）并验证整体肽微阵列完整性和测定质量。

[0262] 用第二抗体山羊抗人IgG（Fc）DyLight680（1:5000）和对照抗体小鼠单克隆抗HA（12CA5）DyLight800（1:2000）进行ApoC3肽微阵列之一的预染色，以研究可能干扰主要测定的第二抗体与抗原衍生肽的背景相互作用。随后将其他ApoC3肽微阵列与抗体样品一起温育，然后用第二和对照抗体染色，并在7/7（红色/绿色）的扫描强度下读出。将构成肽阵列的另外的HA肽染色作为内部质量控制，以确认测定质量和肽微阵列完整性。

[0263] 斑点强度和肽注释的定量是基于扫描强度为7/7的16位灰度tiff文件，其表现出比24位彩色化tiff文件更高的动态范围；使用PepSlide®Analyzer进行微阵列图像分析，并汇总在材料和方法（Material and Methods）中列出的Excel文件中。软件算法将每个斑点的荧光强度分解为原始、前景和背景信号，并计算斑点重复品的平均中值前景强度和点到点偏差差异。基于平均中值前景强度，生成强度地图，并且肽地图中的相互作用由强度颜色代码突出显示，其中红色为高斑点强度，白色为低斑点强度。我们容忍的最大点到点偏差为40%；否则相应的强度值归零。

[0264] 我们进一步绘制了测定的平均斑点强度，其中抗体样品针对从N-末端到C-末端的ApoC3序列，以视觉化总体斑点强度和信噪比。将强度图与肽和强度地图以及与微阵列扫描的视觉检查相关联以鉴定抗体样品识别的表位。鉴定并突出了有助于抗体结合的氨基酸。

[0265] 实施例8：抗ApoC3抗体5E5减少餐后甘油三酯

[0266] 8.1AAV8-huApoC3小鼠模型的产生和表征

[0267] 在本实施例中，我们首先产生并表征了表达人ApoC3的小鼠模型。用携有人ApoC3基因的AAV8载体的 3×10^{11} 个病毒颗粒或用载体对照感染小鼠（C57BL/6）。感染后14天，AAV8-huApoC3小鼠的平均血清huApoC3水平为5.7 μ M。禁食4小时后的循环甘油三酯水平在这些小鼠中为163mg/dL，相比于对照小鼠中的109mg/dL（ $p=0.0065$ ）。为了确定增加的huApoC3对口服脂质负荷的清除的影响，在AAV或载体感染14天后给小鼠口服剂量的橄榄油（10 μ L/克体重）。在时间过程中测量血清甘油三酯水平。在实验的时间过程中，AAV8-huApoC3小鼠中甘油三酯的餐后增加更高（图8，A部分），并且AAV8-huApoC3小鼠中甘油三酯水平随时间的曲线下面积（AUC）高出38%（ $p=0.0047$ ，未配对T检验）（图8，B部分）。总之，注

射 3×10^{11} AAV8-huApoC3病毒颗粒导致小鼠中甘油三酯清除受损,并且可以用作表征抗ApoC3抗体的动物模型。

[0268] 8.2小鼠模型中5E5对餐后脂血症的影响的表征

[0269] 本实施例描述了mAb 5E5在小鼠模型中减少餐后甘油三酯的体内功效。接受 3×10^{11} 个AAV8-huApoC3病毒颗粒的小鼠用于表征抗ApoC3抗体5E5减少餐后甘油三酯,其是吸收自饮食并包装在乳糜微粒中。如图9的A部分所示,5E5抗体的施用导致血清甘油三酯的餐后激增显著减少。餐后甘油三酯的水平升高被降低至约零,并且甘油三酯水平随时间的曲线下面积减少约25%,p值为0.030(图9,B部分)。在橄榄油挑战后2小时和3小时,在5E5的存在下,ApoC3的血清水平显著降低(图9,C部分),而在初始分布期后5E5抗体本身的血清水平缓慢下降(图9,D部分)。

[0270] 8.3材料和方法

[0271] 在本实施例中使用的人AAV8-ApoC3病毒载体获自RegenXbio(Rockville Maryland)。将24只60-63日龄的C57B16雄性小鼠(Charles River)维持在恒定的12小时光照:12小时黑暗的循环中,自由获取水并随意获得标准饮食(Lab Diet;5001)。在每只小鼠腹膜内施用 3×10^{11} 个病毒颗粒后12天,将小鼠眶后窦放血并根据等效平均ApoC3水平分组。在第14天,将小鼠禁食6小时并收集来自眶后窦的25 μ L血液以建立甘油三酯基线。将25mg/kg IgG1形式的5E5抗体注射到腹腔中,然后立即迅速口服(oral bolus)250 μ L橄榄油(Sigma#01514)。在橄榄油挑战后15、30、60、120和240分钟时,通过眶后窦对小鼠放血以测定血浆甘油三酯、ApoC3和测试抗体的水平。将测量值作为时间的函数作图,并使用GraphPad Prism计算血浆甘油三酯的曲线下面积(AUC)。所有动物研究均按照美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南中的建议进行。所有程序均由Vascumab,LLC的机构动物管理及使用委员会批准。

[0272] 通过在黑色96孔板(Costar#3915)中将5 μ L EDTA-血浆与补充有200 μ M Amplex Red(AAT Bioquest)的150 μ L Thermo Scientific™甘油三酯试剂(TR22421)一起温育来分析甘油三酯。在30℃下10分钟后,读取板(激发560nm;发射585nm),并从甘油标准曲线的4-参数拟合(Molecular Devices)计算浓度。

[0273] 用ELISA测定法测定ApoC3水平。将96孔板(Griener#655061)用在PBS中稀释的50 μ L一级ApoC3抗体(Abcam兔多克隆抗人ApoC3#ab21032)在4℃下涂覆过夜。将板用200 μ L TBS-T洗涤4次,并用200 μ L封闭缓冲液(PBS中的Pierce Clear Milk Blocker#37587)在30℃下封闭90分钟。除去封闭缓冲液,加入在封闭缓冲液中稀释的50 μ L测试样品,并在室温下以300rpm旋转温育2小时。将板用200 μ L TBS-T洗涤四次,并加入在封闭缓冲液中稀释的50 μ L二级抗体(Abcam山羊多克隆生物素-缀合物ApoC3#ab21024),并在室温下以300rpm旋转温育1小时。将板用TBS-T洗涤一次,并加入在PBS中稀释100倍的50 μ L SA-HRP(Abcam#34028),并在室温下以300rpm旋转温育30分钟。将板用200 μ L TBS-T洗涤4次,并用80 μ L TMB(Thermo Ultra-TMB ELISA#34028),然后是50 μ L 0.5N HCL显色。在450nm处读取吸光度。从使用纯化的ApoC3(Athens Research and Technology)构建的标准曲线的4-参数拟合(Molecular Devices)计算测试孔中ApoC3的量。

[0274] 用ELISA测定法测定5E5抗体的水平。将96孔板(Griener#655061)用在PBS中稀释的50 μ L一级IgG抗体(Fitzgerald 41-XG57山羊抗人IgG Fc多克隆)在4℃下涂覆过夜。将板

用200 μ L TBS-T洗涤4次,并用200 μ L由PBS中的3%BSA (Roche BSA级分V无蛋白酶#03117332001)和清乳(Pierce Clear Milk Blocker#37587)组成的封闭缓冲液在30 $^{\circ}$ C下封闭90分钟。除去封闭缓冲液,加入在封闭缓冲液中稀释的50 μ L测试样品,并在室温下以300rpm旋转温育2小时。将板用200 μ L TBS-T洗涤四次,并加入在封闭缓冲液中稀释的50 μ L二级抗体(Abcam山羊抗人IgG-Fc(生物素)多克隆#ab97223)并在室温下以300rpm旋转温育1小时。将板用TBS-T洗涤一次,并加入在PBS中稀释100倍的50 μ L SA-HRP(Abcam#34028),并在室温下以300rpm旋转温育30分钟。将板用200 μ L TBS-T洗涤4次,并用80 μ L TMB(Thermo Ultra-TMB ELISA#34028),然后是50 μ L 0.5N HCL显色。在450nm处读取吸光度。从使用纯化的测试抗体构建的标准曲线的4-参数拟合(Molecular Devices)计算测试孔中IgG的量。

[0275] 实施例9:在鼠模型中通过5E5和6A6抗体减少ApoC3和ApoB

[0276] 如8.1部分所述产生并处理表达人ApoC3的小鼠。在AAV感染后12天,从眶后窦收集血样以建立基线(T=0)人ApoC3和小鼠ApoB水平。然后将小鼠分组,使得所有组在T0时具有相似的平均ApoC3水平。在初始AAV感染后14天,通过注射入背部皮下空间给每只小鼠施用单剂量的25mg/kg的IgG1形式的5E5抗体或单剂量的20mg/kg的IgG1形式的6A6抗体。在施用测试抗体后0、2、4、8和24小时,并且之后大约每2天,总共30天,从眶后窦收集血样。所有动物研究均按照美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南中的建议进行。

[0277] 用ELISA测定法测定人ApoC3和小鼠ApoB的血浆水平。具体而言,将96孔板(Griener#655061)用在PBS中稀释的50 μ L一级ApoC3抗体(Abcam兔多克隆抗人ApoC3#ab21032)或50 μ L一级ApoB抗体(Meridian Life Sciences山羊多克隆抗人ApoB#K45253G)在4 $^{\circ}$ C下涂覆过夜。将板用200 μ L TBS-T洗涤4次,并用200 μ L封闭缓冲液(PBS中的Pierce Clear Milk Blocker#37587)在30 $^{\circ}$ C下封闭90分钟。除去封闭缓冲液,加入在封闭缓冲液中稀释的50 μ L测试样品,并在室温下以300rpm旋转温育2小时。将板用200 μ L TBS-T洗涤四次,加入在封闭缓冲液中稀释的50 μ L二级ApoC3抗体(Abcam山羊多克隆生物素-缀合物ApoC3#ab21024)或二级ApoB抗体(Meridian Life Sciences山羊多克隆生物素-缀合物ApoB48/100#34003G)稀释并在室温下以300rpm旋转温育1小时。将板用TBS-T洗涤一次,加入在PBS中稀释100倍的50 μ L SA-HRP(Abcam#64269),并在室温下以300rpm旋转温育30分钟。然后将板用200 μ L TBS-T洗涤4次,并用80 μ L TMB(Thermo Ultra-TMB ELISA#34028),然后是50 μ L 0.5N HCL显色。在450nm处读取吸光度。从使用纯化的ApoC3(Athens Research and Technology)构建的标准曲线的4-参数拟合(Molecular Devices)计算测试孔中ApoC3的量。从使用使用通过离心分离的小鼠VLDL构建的标准曲线的4-参数拟合(Molecular Devices)计算测试孔中ApoB的量(假设ApoB含量为总蛋白质含量的20%)。

[0278] 如图10中所示,相对于阴性对照组中的相应水平,5E5抗体(A部分和B部分)和6A6抗体(C部分和D部分)相似地使人ApoC3和小鼠ApoB的血浆水平降低1-2天。在施用5E5和6A6抗体后4-8小时,ApoC3的血浆水平降低超过50%(A部分和C部分)。在施用5E5和6A6抗体后4-8小时,ApoB的血浆水平降低约40-50%(B部分和D部分)。

[0279] 本发明不限于本文所述的具体实施方式的范围。实际上,除了所描述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言,将从前面的描述和附图而变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0280] 本文引用的所有参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)出于所有目的且通过

引用整体并入本文,其程度如同每个单独的参考文献(例如,出版物或专利或专利申请)被具体且单独指出出于所有目的而通过引用整体并入。

[0281] 其他实施方式在以下权利要求内。

序列表

<110> Staten Biotechnology B.V.

<120> 抗 APOC3 抗体及其使用方法

<130> 591438: SBW-003PC

<150> US 62/360,084

<151> 2016-07-08

<150> US 62/491,591

<151> 2017-04-28

<160> 183

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 79

<212> PRT

[0001] <213> 智人

<400> 1

Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met
1 5 10 15

Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu
20 25 30

Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser
35 40 45

Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys Phe Ser Glu Phe
50 55 60

Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala
65 70 75

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu

1 5 10

[0002]

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 CDRH1

<400> 4

Thr Arg Tyr Tyr Ala

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 CDRH2

<400> 5

Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 CDRH3

<400> 6

Val Arg Leu Ile Glu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr
1 5 10

[0003]

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 CDRH1

<400> 7

Thr Tyr Ser Met Arg
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 CDRH2

<400> 8

Ser Ile Ser Thr Asp Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 5E5 CDRH3

<400> 9

Ala Gly Tyr Ser Asp
1 5

[0004]

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 6A6 CDRH1

<400> 10

Ser Tyr Ala Gly Arg
1 5

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 6A6 CDRH2

<400> 11

Ser Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6A6 CDRH3

<400> 12

Asn Ser Tyr Arg Tyr
1 5

[0005]

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8F4 CDRH1

<400> 13

Ser Tyr Ser Met Tyr
1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8F4 CDRH2

<400> 14

Ala Ile Lys Thr Asp Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 8F4 CDRH3

<400> 15

Gln Gly Tyr Gly Thr
1 5

[0006]

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11H1 CDRH1

<400> 16

Ser Tyr Ser Met Arg
1 5

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11H1 CDRH2

<400> 17

Ser Ile Lys Ser Asp Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11H1 CDRH3

<400> 18

[0007] Gln Gly Tyr Ile Asn
1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A4 CDRH1

<400> 19

His Tyr Thr Met Tyr
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A4 CDRH2

<400> 20

Ala Ile Ser Gly Gly Gly Asp Arg Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A4 CDRH3

[0008]

<400> 21

Gln Gly Tyr Glu Tyr
1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 CDRH1

<400> 22

Asn Arg Arg Tyr Ala
1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 CDRH2

<400> 23

Val Ile Val Tyr Asp Gly Asn Thr His Val Ser Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 CDRH3

<400> 24

[0009] Val Leu Leu Leu Arg Asp Pro Leu Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 CDRH1

<400> 25

Asn Tyr Ala Met Arg
1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 CDRH2

<400> 26

Ser Ile Asp Ser Gly Gly Asp Arg Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 CDRH3

[0010]

<400> 27

Gln Gly Tyr Ile Phe
1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 CDRH1

<400> 28

Asn Ala Tyr Leu Tyr
1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 CDRH2

<400> 29

Gly Ile Asn Pro Ala Gly Asp Gly Arg Ala Tyr Ala Thr Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 CDRH3

<400> 30

Ala Ser Arg Val Val Ala Tyr Asp Ser

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8H4 CDRH2

<400> 31

Ser Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

[0011]

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 8H4 CDRH3

<400> 32

Gln Gly Tyr Thr Asp
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0012]

<220>
<223> 10B6 CDRH1

<400> 33

Ser Tyr Ala Met Arg
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 10B6 CDRH2

<400> 34

Ser Ile Asn Ile Asp Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Thr Asp Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B6 CDRH3

<400> 35

Gln Gly Tyr Ile Tyr

1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

[0013] <213> 人工序列

<220>

<223> 12A3 CDRH2

<400> 36

Ser Ile Asn Ile Ala Gly Ser Ser Val Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12A3 CDRH3

<400> 37

Gln Gly Phe Val Tyr

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C3 CDRH1

<400> 38

Ser Tyr Ser Met Phe

1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

[0014]

<220>

<223> 12C3 CDRH2

<400> 39

Gly Ile Asn Gly Gly Gly Asp Arg Ser Asn Tyr Ala Asp Ser Val Arg

1 5 10 15

Asp

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C3 CDRH3

<400> 40

Gln Gly Tyr Ala Tyr
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C12 CDRH1

<400> 41

Thr Ser Tyr Tyr Ala Trp Thr
1 5

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

[0015] <213> 人工序列

<220>

<223> 12C12 CDRH2

<400> 42

Ala Ile Val Tyr Asp Gly Ser Thr Phe Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C12 CDRH3

<400> 43

Ser Tyr Gly Leu Gly Leu Tyr Asp Leu

1 5

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 44

Asp Lys Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

[0016] Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 46

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D4 CDRH1

<400> 47

Ser Ser Asn Met Arg

1 5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D4 CDRH2

<400> 48

Thr Ile Ser Pro Asp Gly Gly Lys Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

[0017]

Gly

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D4 CDRH3

<400> 49

Ala Gly Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12E12 CDRH1

<400> 50

Asn Ile Tyr Met Ser

1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12E12 CDRH2

<400> 51

[0018]

Ala Ile Asn Thr Ala Gly Thr Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12E12 CDRH3

<400> 52

Gly Glu Val Asp

1

<210> 53

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13C7 CDRH1

<400> 53

Arg Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13C7 CDRH2

[0019] <400> 54

Ser Ile Tyr Lys Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13C7 CDRH3

<400> 55

Ala Leu Arg Ala Glu Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13G7 CDRH1

<400> 56

Thr Thr Ala Pro Ala Trp Gly
1 5

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13G7 CDRH2

[0020]

<400> 57

Val Ile Ala Phe Asp Gly Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13G7 CDRH3

<400> 58

Leu Gly Gly Arg Asn Tyr Pro Pro Tyr Val Glu Leu
1 5 10

<210> 59

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14C4 CDRH1

<400> 59

Asn Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14C4 CDRH2

[0021] <400> 60

Val Ile Asn Ser Asp Gly Asp Gly Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14C4 CDRH3

<400> 61

Ala Asn Leu Gly Leu
1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 CDRH1

<400> 62

Thr Asn Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 CDRH2

[0022]

<400> 63

Ala Ile Asp Tyr Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 CDRH3

<400> 64

Arg Ile Pro Thr Gly Glu Tyr

1 5

<210> 65

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14G4 CDRH1

<400> 65

Arg Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14G4 CDRH2

[0023] <400> 66

Ala Ile Ser Pro Asp Gly Gly Lys Thr Ile Asp Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14G4 CDRH3

<400> 67

Gly His Asn Met Asp Tyr
1 5

<210> 68
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 CDRH1

<400> 68

Asp Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 CDRH2

<400> 69

[0024] Ala Ile Thr Ser Asn Gly Lys Arg Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Met Lys

1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 CDRH3

<400> 70

Gly Pro Pro His Tyr Ile Pro Ile Pro Ser Met Thr Pro Arg Asp Ser

1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12G8 CDRH2

<400> 71

Ala Ile Arg Trp Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met Lys
1 5 10 15

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12G8 CDRH3

<400> 72

His Arg Pro Gly Gly Ala Leu Asp Thr
1 5

[0025]

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 CDRL1

<400> 73

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gly
1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 CDRL2

<400> 74

Ser Thr Ser Ser Arg His Ser
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 CDRL3

<400> 75

Ala Leu Asp Ile Gly Ser Tyr Ile Val
1 5

[0026]

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 CDRL1

<400> 76

Lys Thr Ser Gln Gly Leu Val His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Phe Tyr
1 5 10 15

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 CDRL2

<400> 77

Gln Val Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 CDRL3

<400> 78

Ala Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro His Thr
1 5

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

[0027] <213> 人工序列

<220>

<223> 6A6 CDRL1

<400> 79

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Ile His Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6A6 CDRL2

<400> 80

Gln Val Ser Ser His Glu Ser

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6A6 CDRL3

<400> 81

Ala Gln Ala Thr Tyr Asn Pro Arg Thr

1 5

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0028]

<220>

<223> 8F4 CDRL1

<400> 82

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8F4 CDRL2

<400> 83

Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8F4 CDRL3

<400> 84

Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Gly His Ser

1 5

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11H1 CDRL1

[0029]

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ile His Ser Ala Gly Lys Thr Tyr Phe Tyr

1 5 10 15

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11H1 CDRL2

<400> 86

Gln Val Ser Asn Arg Glu Ser

1 5

<210> 87

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11H1 CDRL3

<400> 87

Ala Gln Gly Thr Tyr Asn Pro Lys Thr
1 5

<210> 88
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 5A4 CDRL1

[0030] <400> 88

Lys Ala Ile Gln Ser Leu Val His Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 5A4 CDRL2

<400> 89

Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 90
<211> 14
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 CDRL1

<400> 90

Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ala Tyr Asn Phe Val Ser
1 5 10

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 CDRL2

<400> 91

[0031] Asp Ile Asp Lys Arg Ala Ser
1 5

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 CDRL3

<400> 92

Ala Ala Tyr Gly Ser Arg Asp Asn Val Val
1 5 10

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 CDRL2

<400> 93

Gln Val Ser Asn His Glu Ser

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 CDRL3

<400> 94

Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr

1 5

[0032]

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 CDRL1

<400> 95

Lys Ser Ser Gln Ser Val Glu Ser Gly Ser Asp Gln Lys Ser Tyr Leu

1 5 10 15

Asn

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 CDRL2

<400> 96

Tyr Ala Ser Thr Gln Glu Ser

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 CDRL3

<400> 97

[0033] Gln Gln Ala Tyr Ser Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 98

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8H4 CDRL1

<400> 98

Lys Val Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8H4 CDRL2

<400> 99

Gln Val Ser Asn Arg Asp Ser

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8H4 CDRL3

<400> 100

Ala Gln Gly Thr Tyr Asn Pro Tyr Thr

1 5

[0034]

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B6 CDRL1

<400> 101

Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Val Ile Tyr Phe Tyr

1 5 10 15

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B6 CDRL3

<400> 102

Ala Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro His Ser
1 5

<210> 103

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12A3 CDRL1

<400> 103

Lys Ala Gly Arg Ser Leu Val His Ser Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

[0035]

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12A3 CDRL2

<400> 104

Gln Val Ser Asn Arg Ser Ser
1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12A3 CDRL3

<400> 105

Ala Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Val Thr
1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C3 CDRL2

<400> 106

Gln Thr Ser Asn Arg Gly Ser
1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

[0036] <213> 人工序列

<220>

<223> 12C3 CDRL3

<400> 107

Ala Gln Ala Thr Tyr Ser Pro His Thr
1 5

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C12 CDRL1

<400> 108

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Tyr Val Asn

1 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C12 CDRL2

<400> 109

Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0037]

<220>

<223> 12C12 CDRL3

<400> 110

Ser Ser Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val

1 5 10

<210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D1 CDRL1

<400> 111

Lys Thr Ser Gln Ser Leu Thr His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

[0038]

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HA control peptide

<400> 112

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly

1 5 10

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D1 CDRL3

<400> 113

Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Pro His Thr

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D4 CDRL2

<400> 114

Gln Val Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 115

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 12D4 CDRL3

<400> 115

Ala Gln Ala Thr Tyr Ala Pro His Ser
1 5

<210> 116
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 12E12 CDRL1

[0039]

<400> 116

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Val Thr Tyr Pro Gly
1 5 10

<210> 117
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 12E12 CDRL2

<400> 117

Asn Thr Asn Ser Arg Phe Ser
1 5

<210> 118
<211> 12
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12E12 CDRL3

<400> 118

Ser Val Tyr Ile Gly Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Val

1 5 10

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13C7 CDRL1

<400> 119

[0040] Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ala

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13C7 CDRL2

<400> 120

Glu Val Asn Lys Arg Ala Ser

1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13C7 CDRL3

<400> 121

Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Asn Ser Tyr Val

1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13G7 CDRL1

<400> 122

Gln Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Tyr Ala His

1 5 10

[0041]

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13G7 CDRL2

<400> 123

Asp Asp Asp Ser Arg Pro Ser

1 5

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13G7 CDRL3

<400> 124

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Asp Asn Trp Val
1 5 10

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C4 CDRL1

<400> 125

Lys Ala Thr Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

[0042]

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C4 CDRL3

<400> 126

Ala Gln Ala Pro Tyr Trp Thr
1 5

<210> 127

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 CDRL1

<400> 127

Gly Leu Asn Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser Asn Tyr Pro Asp
1 5 10

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 CDRL2

<400> 128

Asn Thr Asn Ser Arg His Ser
1 5

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

[0043] <213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 CDRL3

<400> 129

Ala Leu Tyr Met Gly Ser Asp Ser Val Val
1 5 10

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14G4 CDRL3

<400> 130

Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 CDRL1

<400> 131

Gln Gly Gly Thr Leu Gly Arg Tyr Tyr Gly Ser
1 5 10

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0044]

<220>

<223> 12D7 CDRL2

<400> 132

Gly Asp Asn Ser Arg Pro Ser
1 5

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 CDRL3

<400> 133

Glu Ser Phe Asp Phe Ser Gly Asn Ala Ala Val
1 5 10

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12G8 CDRL1

<400> 134

Gln Gly Gly Asn Phe Gly Asn Phe Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 135

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12G8 CDRL2

[0045]

<400> 135

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12G8 CDRL3

<400> 136

Gln Ser Gly Ser Ser Ser Asp Asn Val Val
1 5 10

<210> 137

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 VH

<400> 137

Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Ile Thr Thr Arg
20 25 30

Tyr Tyr Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

[0046]

Trp Met Gly Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Leu Ile Glu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 138

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 VH

<400> 138

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Thr Tyr
20 25 30

Ser Met Arg Trp Val Arg Gln Val Pro Arg Lys Ala Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Thr Asp Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

[0047]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ile Ala Gly Tyr Ser Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 139

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6A6 VH

<400> 139

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Gly Arg Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ala Gly Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0048]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Gln Asn Ser Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Ala Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 140

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8F4 VH

<400> 140

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val
35 40 45

Ala Ala Ile Lys Thr Asp Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0049]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ile Gln Gly Tyr Gly Thr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 141

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11H1 VH

<400> 141

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ser Ser Ile Lys Ser Asp Gly Ser Ile Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0050] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 142

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A4 VH

<400> 142

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser His Tyr			
20	25	30	
Thr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Val Arg Gly Leu Glu Arg Val			
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Asp Arg Thr Ile Tyr Thr Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Ala Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
[0051]			
Val Ala Gln Gly Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val			
100	105	110	
Ser Ser			
<210>	143		
<211>	122		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	5A7 VH		
<400>	143		
Glu Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln			
1	5	10	15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Thr Asn Arg
20 25 30

Arg Tyr Ala Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Met Gly Val Ile Val Tyr Asp Gly Asn Thr His Val Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

[0052] Cys Ala Arg Val Leu Leu Leu Arg Asp Pro Leu Ser Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 144

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 VH

<400> 144

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr

20

25

30

Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Glu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asp Ser Gly Gly Asp Arg Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ser Gln Gly Tyr Ile Phe Trp Gly Gln Gly Ala Gln Val Thr Val
100 105 110

[0053]

Ser Ser

<210> 145

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 VH

<400> 145

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Pro Ala Gly Asp Gly Arg Ala Tyr Ala Thr Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Ala Ser Arg Val Val Ala Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

[0054] Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 146

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8H4 VH

<400> 146

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Arg Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Thr Ser Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Val Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Gln Gly Tyr Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

[0055]

<210> 147

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 10B6 VH

<400> 147

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Asp Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gln Gly Tyr Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

[0056] <210> 148
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 12A3 VH

<400> 148

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Asn Ile Ala Gly Ser Ser Val Val Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Met Gln Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

[0057]

<210> 149

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C3 VH

<400> 149

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Phe Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Arg Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Gly Gly Gly Asp Arg Ser Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Arg Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ile Gln Gly Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 150
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

[0058] <220>
<223> 12C12

<400> 150

Glu Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Ser
20 25 30

Tyr Tyr Ala Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Gly Ala Ile Val Tyr Asp Gly Ser Thr Phe Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe

65	70	75	80
Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
	85	90	95
Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Leu Gly Leu Tyr Asp Leu Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	151		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
[0059] <223>	12G8 VL		
<400>	151		
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Phe Gly Asn Phe Tyr Ala			
	20	25	30
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr			
	35	40	45
Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
	50	55	60
Ser Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu			
65	70	75	80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Asp Asn Val
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 152

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D4 VH

<400> 152

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0060]

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Met Arg Trp Val Arg Gln Val Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ser Pro Asp Gly Gly Lys Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu His
65 70 75 80

Leu Gln Met Val Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Ala Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

	100	105	110
	Ser Ser		
<210>	153		
<211>	113		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	12E12 VH		
<400>	153		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
[0061]	Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Asn Ile		
	20 25 30		
	Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ser Ala Ile Asn Thr Ala Gly Thr Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala His Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Thr Thr Gly Glu Val Asp Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
	100 105 110		

Ser

<210> 154

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13C7 VH

<400> 154

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

[0062]

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Lys Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ala Leu Arg Ala Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 155
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 13G7 VH

<400> 155

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Thr
20 25 30

[0063] Ala Pro Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Asp
35 40 45

Trp Met Ala Val Ile Ala Phe Asp Gly Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Leu Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Leu Gly Gly Arg Asn Tyr Pro Pro Tyr Val Glu Leu Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 156
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 14C4 VH

<400> 156

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Tyr
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

[0064]

Ser Val Ile Asn Ser Asp Gly Asp Gly Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Arg Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Ala Asn Leu Gly Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 157

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14C7 VH

<400> 157

Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Asn
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

[0065]

Trp Met Gly Ala Ile Asp Tyr Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Arg Ile Pro Thr Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 158

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14G4 VH

<400> 158

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Pro Asp Gly Gly Lys Thr Ile Asp Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0066]

Lys Gly Ala Phe Ala Ser Ser Arg Asp Asn Thr Met Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Asp Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Ala Gly His Asn Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Ile Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 159

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 VH

<400> 159

Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Thr Ser Asn Gly Lys Arg Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Met
50 55 60

[0067]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Lys Gly Pro Pro His Tyr Ile Pro Ile Pro Ser Met Thr Pro Arg
100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 160

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12G8 VH

<400> 160

Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Arg Trp Asn Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Met Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Asp Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

[0068]

Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Arg Pro Gly Gly Ala Leu Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 161

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A11 VL

<400> 161

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Thr Arg
20 25 30

Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ser
35 40 45

Leu Ile His Ser Thr Ser Ser Arg His Ser Gly Ile Pro Thr Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

[0069] Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Ile Gly Ser
85 90 95

Tyr Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 162

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5E5 VL

<400> 162

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gln Gly Leu Val His Ser

20

25

30

Asp Gly Lys Thr Tyr Phe Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Gln Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0070]

<210> 163

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 6A6 VL

<400> 163

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Ile His Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Arg
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Ser His Glu Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala
85 90 95

Thr Tyr Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 164

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0071] <220>

<223> 8F4 VL

<400> 164

Asp Leu Val Leu Thr Gln Ile Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65	70	75	80
Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala			
85	90	95	
Thr Tyr Tyr Gly His Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 165			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 11H1 VL			
<400> 165			
[0072] Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Thr Ile Val Pro Gly			
1 5 10 15			
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ile His Ser			
20 25 30			
Ala Gly Lys Thr Tyr Phe Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Arg			
35 40 45			
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro			
50 55 60			
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65 70 75 80			
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly			
85 90 95			

Thr Tyr Asn Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 166

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A4 VL

<400> 166

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ile Gln Ser Leu Val His Thr
20 25 30

[0073]

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Tyr Ser Ser Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 167

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 5A7 VL

<400> 167

Ser Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Gly Thr Leu Gly Lys
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ala Tyr
20 25 30

Asn Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

[0074]

Leu Ile Tyr Asp Ile Asp Lys Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Gly Ser Arg
85 90 95

Asp Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 168

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8A4 VL

<400> 168

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Arg
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn His Glu Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

[0075]

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala
85 90 95

Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 169

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8B4 VL

<400> 169

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Glu Ser Gly
20 25 30

Ser Asp Gln Lys Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Gln Glu Ser Gly Ile
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

[0076] Ala Tyr Ser Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 170

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 8H4 VL

<400> 170

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Val Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20	25	30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
35	40	45
Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75 80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly		
85	90	95
Thr Tyr Asn Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

[0077]

<210> 171
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 10B6 VL

<400> 171

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Ile Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Val Ile Tyr Phe Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly
85 90 95

Thr Tyr Tyr Pro His Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Gln Ile Lys
100 105 110

<210> 172

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0078] <220>

<223> 12A3 VL

<400> 172

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Asn Ile Ser Cys Lys Ala Gly Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Ser Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65	70	75	80
Thr Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly			
85	90	95	

Thr Tyr Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys		
100	105	110

<210> 173
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 12C3 VL

<400> 173

[0079] Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser		
20	25	30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
35	40	45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro		
50	55	60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asp Ile		
65	70	75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala		
85	90	95

Thr Tyr Ser Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 174

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12C12 VL

<400> 174

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
20 25 30

[0080]

Tyr Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 175

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D1 VL

<400> 175

Ser Ala Leu Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val
1 5 10 15

Val Pro Gly Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gln Ser Leu
20 25 30

Thr His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro
35 40 45

[0081]

Gly Gln Ser Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Lys Ile Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Ser Arg Leu
100 105 110

Glu Ile Glu Arg
115

<210> 176

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D4 VL

<400> 176

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
50 55 60

[0082]

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala
85 90 95

Thr Tyr Ala Pro His Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 177

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12E12 VL

<400> 177

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Val
20 25 30

Thr Tyr Pro Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

[0083] Leu Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Tyr Ile Gly Gly
85 90 95

Gly Ile Tyr Pro Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 178

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13C7 VL

<400> 178

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr

20

25

30

Asn Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Ser Glu Val Asn Lys Arg Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser
85 90 95

Asn Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

[0084]

<210> 179

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 13G7 VL

<400> 179

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ala Leu Ser Val Thr Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ser Tyr
35 40 45

Asp Asp Asp Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ala Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Asp Asn
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 180

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

[0085] <220>

<223> 14C4 VL

<400> 180

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65	70	75	80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala			
85	90	95	
Pro Tyr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 181			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 14C7 VL			
<400> 181			
[0086] Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly			
1 5 10 15			
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Asn Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser			
20 25 30			
Asn Tyr Pro Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu			
35 40 45			
Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe			
50 55 60			
Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
65 70 75 80			
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Met Gly Ser			
85 90 95			

Asp Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 182

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 14G4 VL

<400> 182

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

[0087]

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala
85 90 95

Thr Tyr Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Leu Glu Val Lys
100 105 110

<210> 183

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12D7 VL

<400> 183

Ser Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Thr Leu Gly Arg Tyr Tyr Gly
20 25 30

[0088] Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Gly Asp Asn Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ser Phe Asp Phe Ser Gly Asn Ala
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100 105

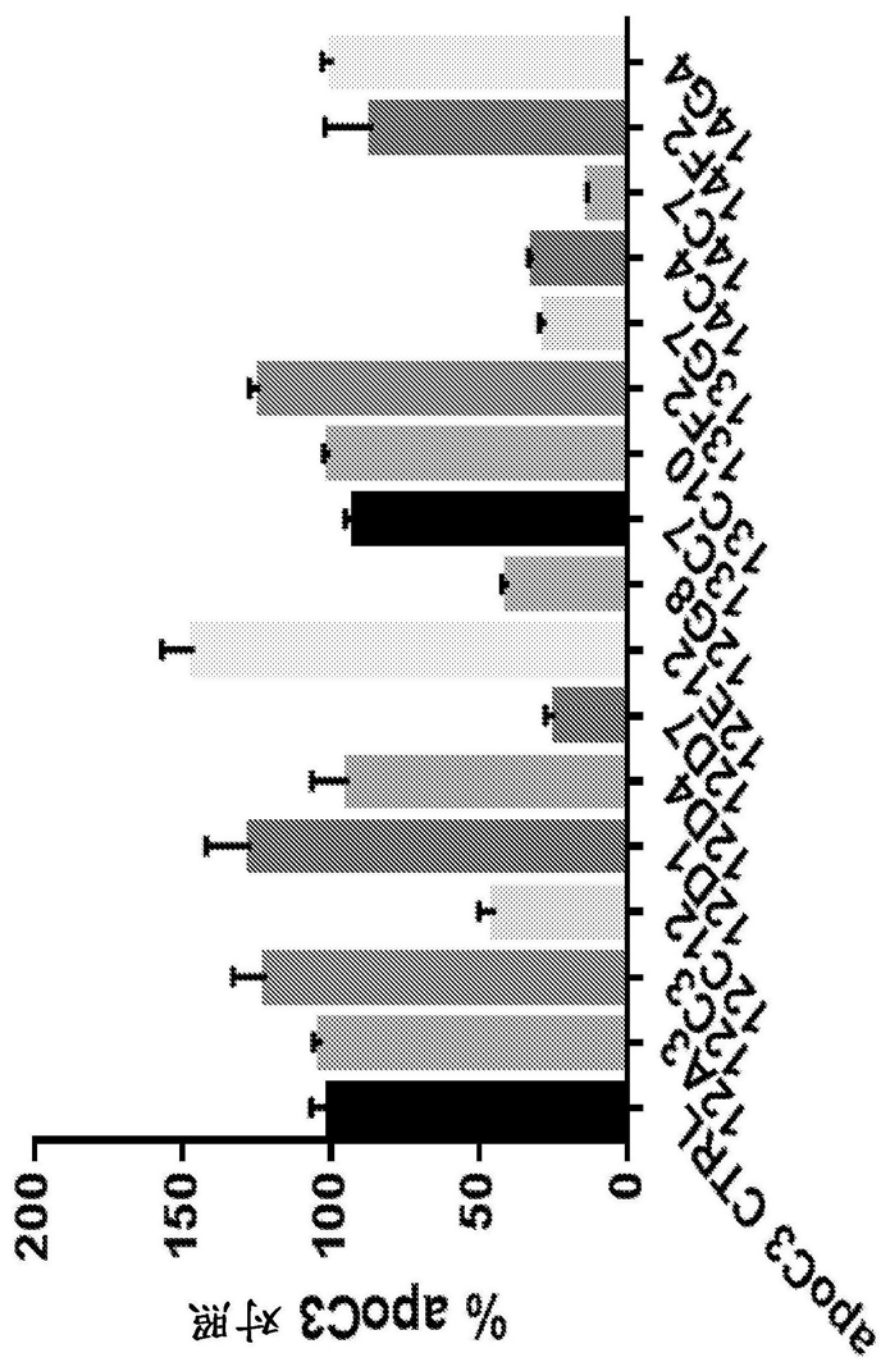


图1

A

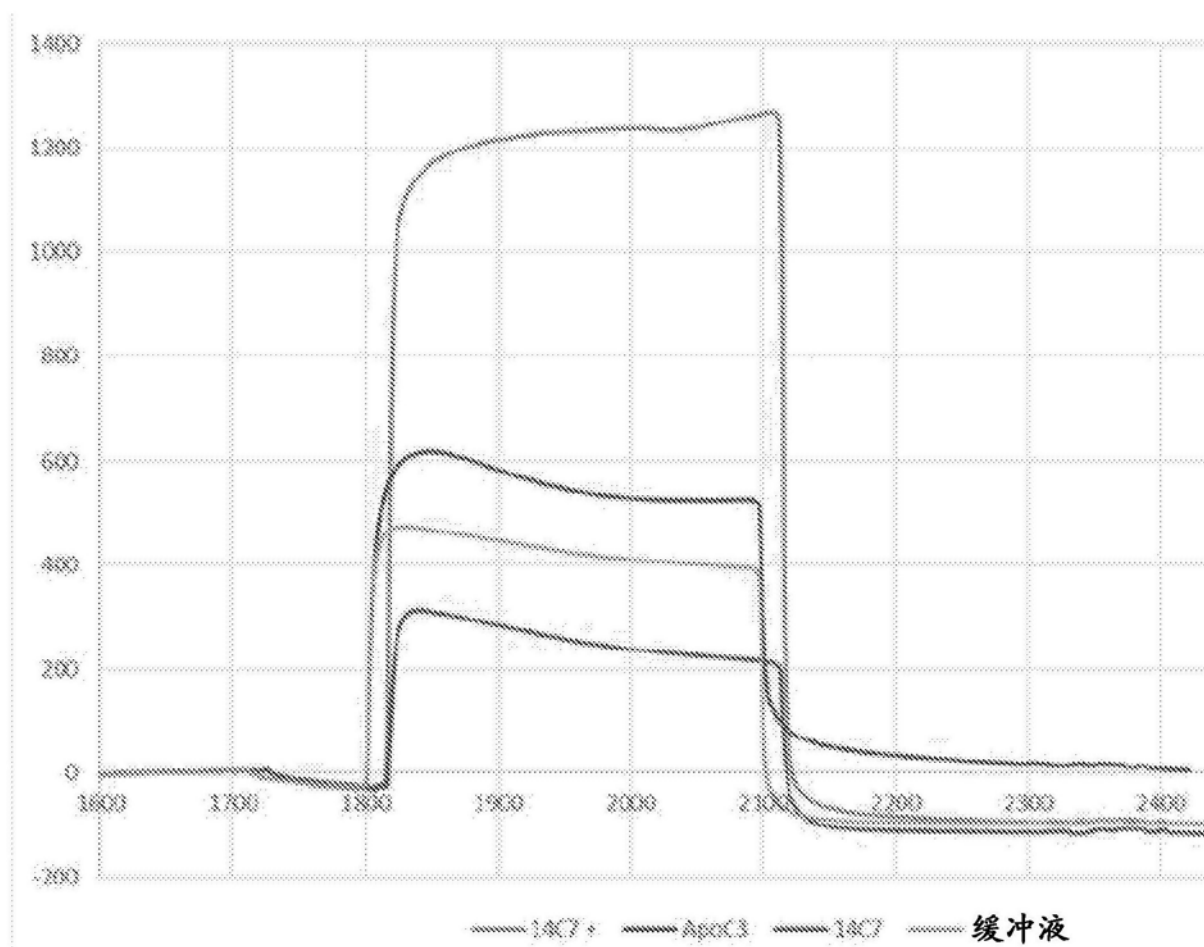


图2

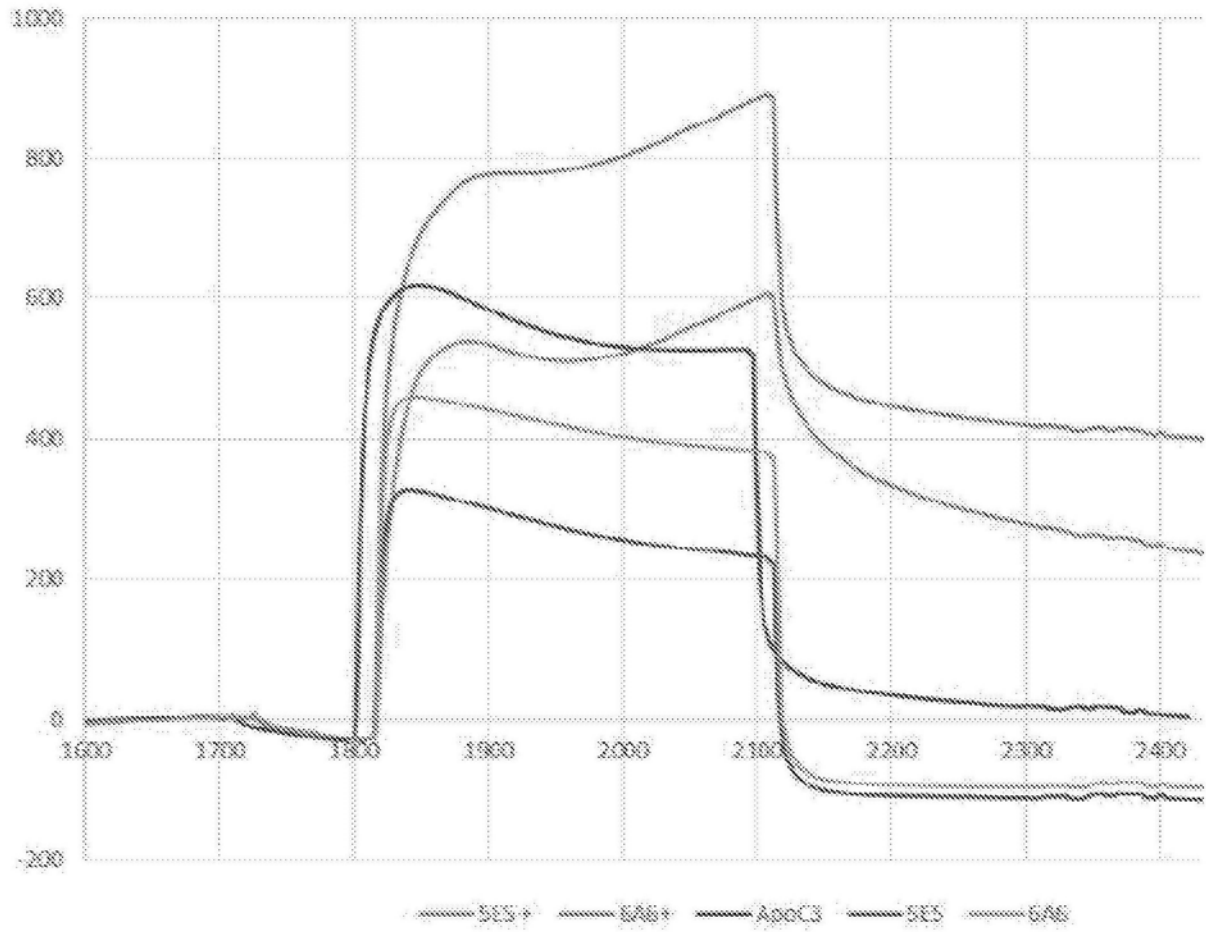
B

图2(续)

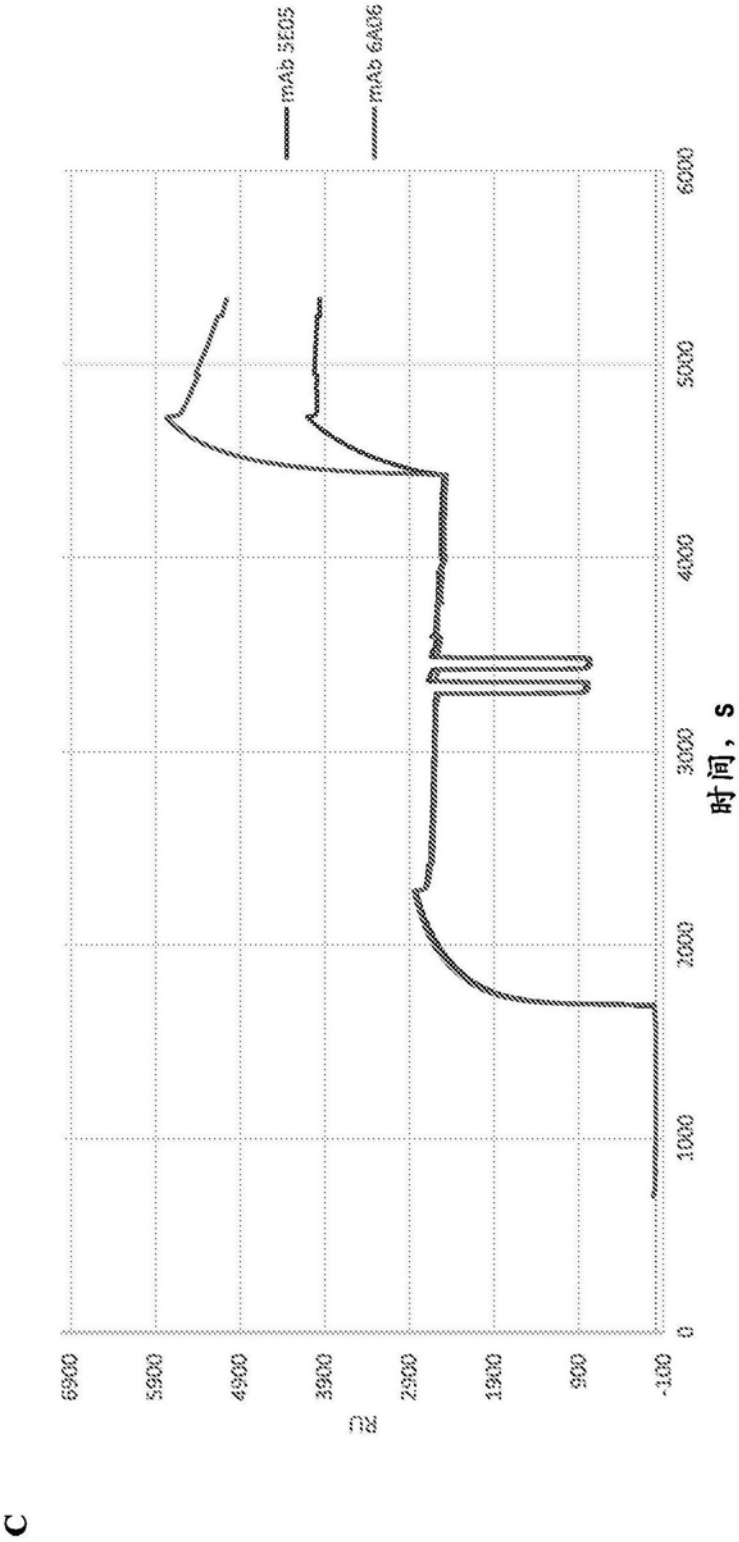


图2(续)

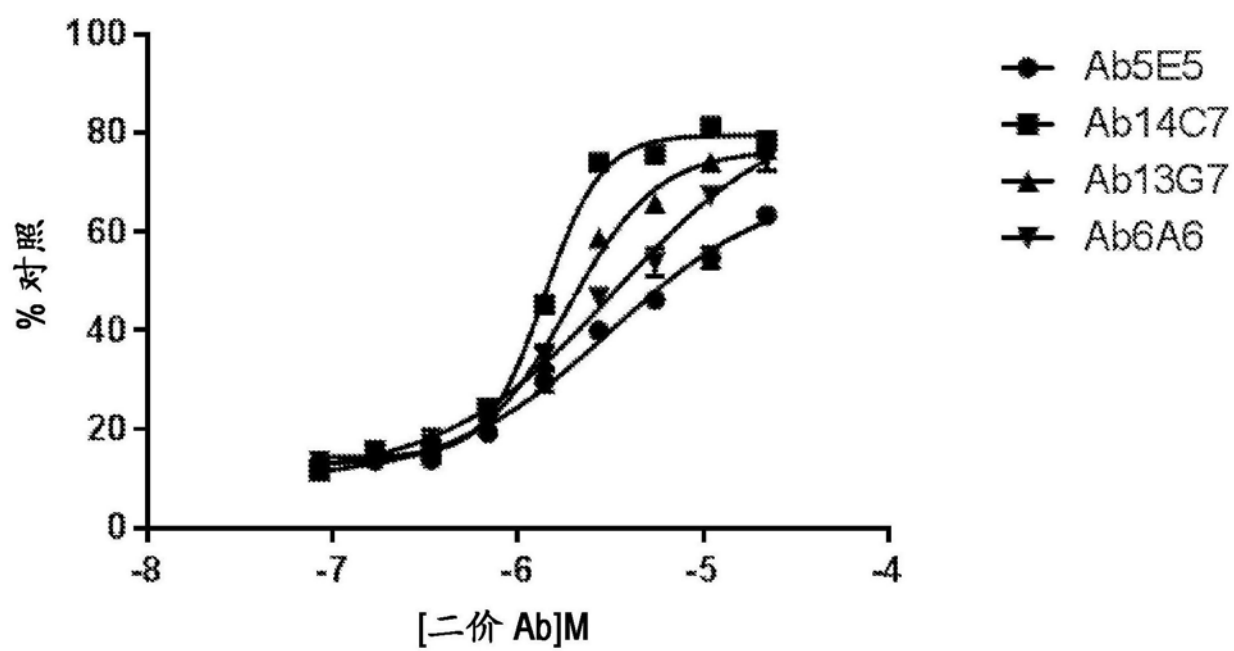


图3

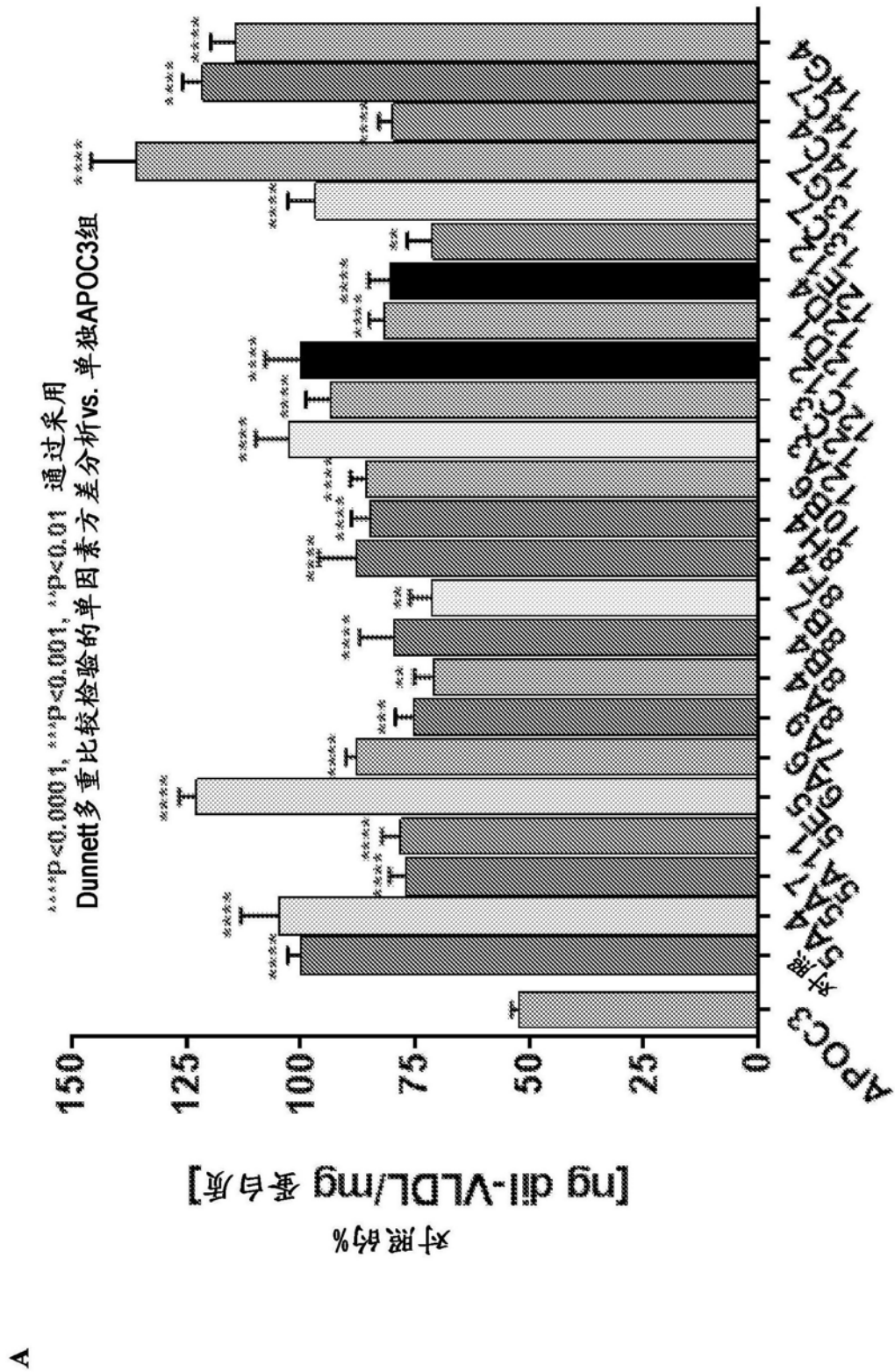


图4

B

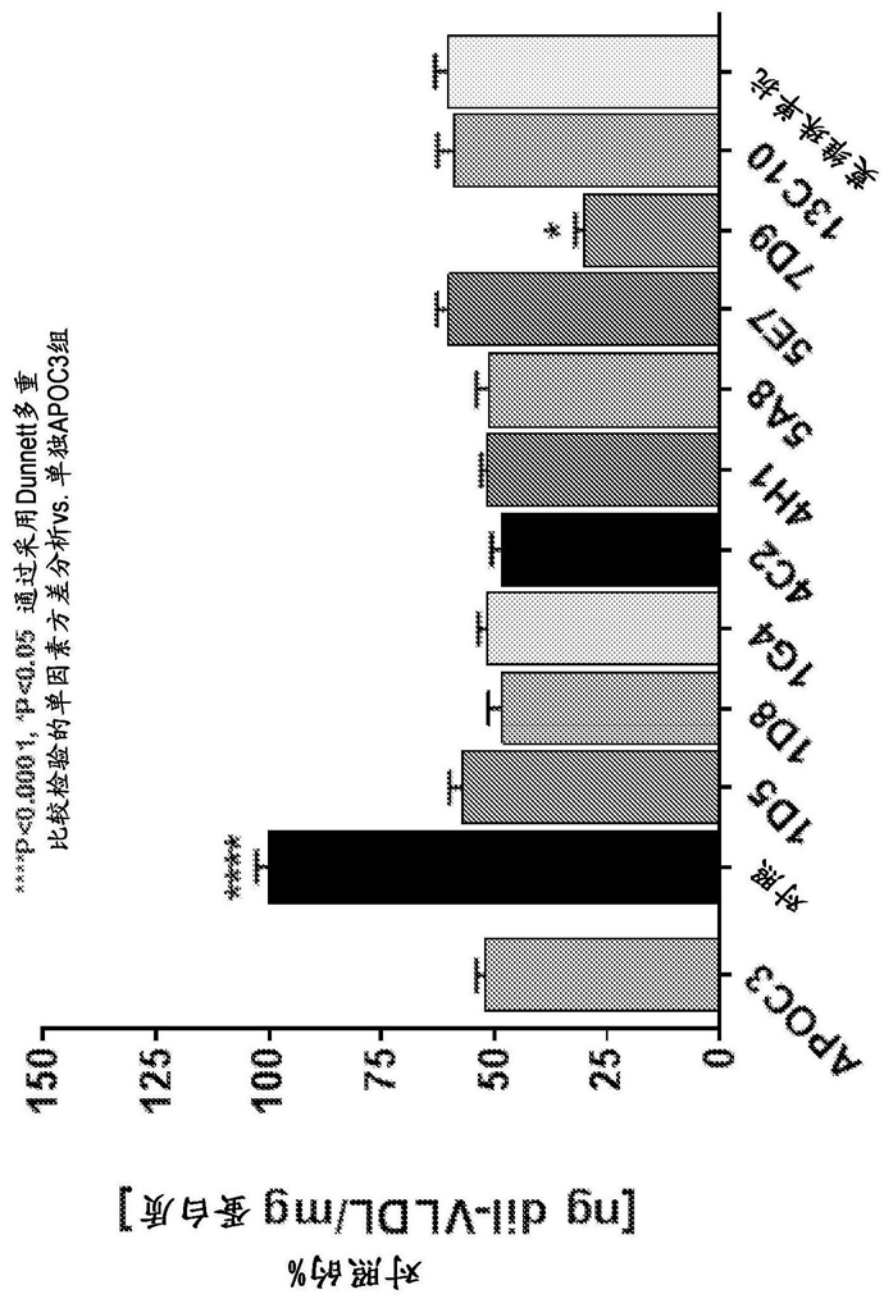


图4 (续)

A

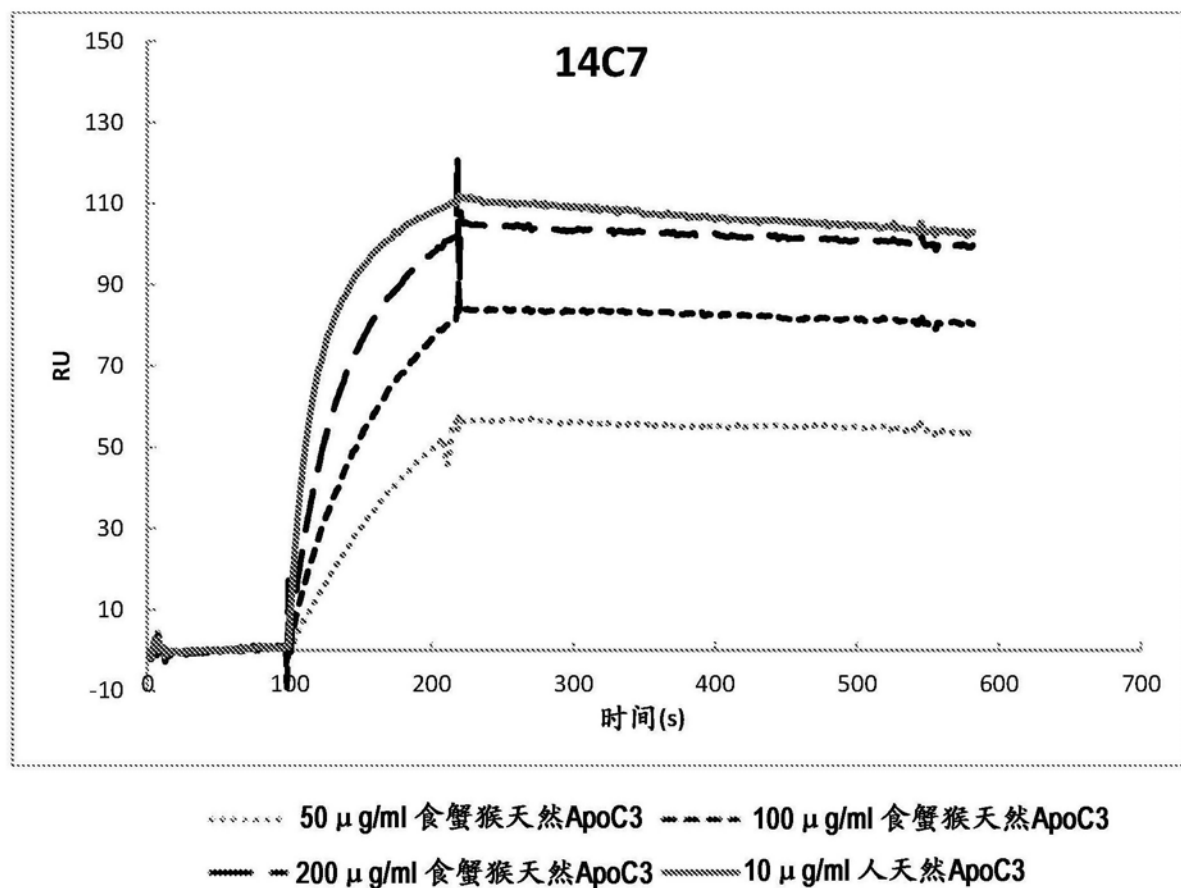


图5

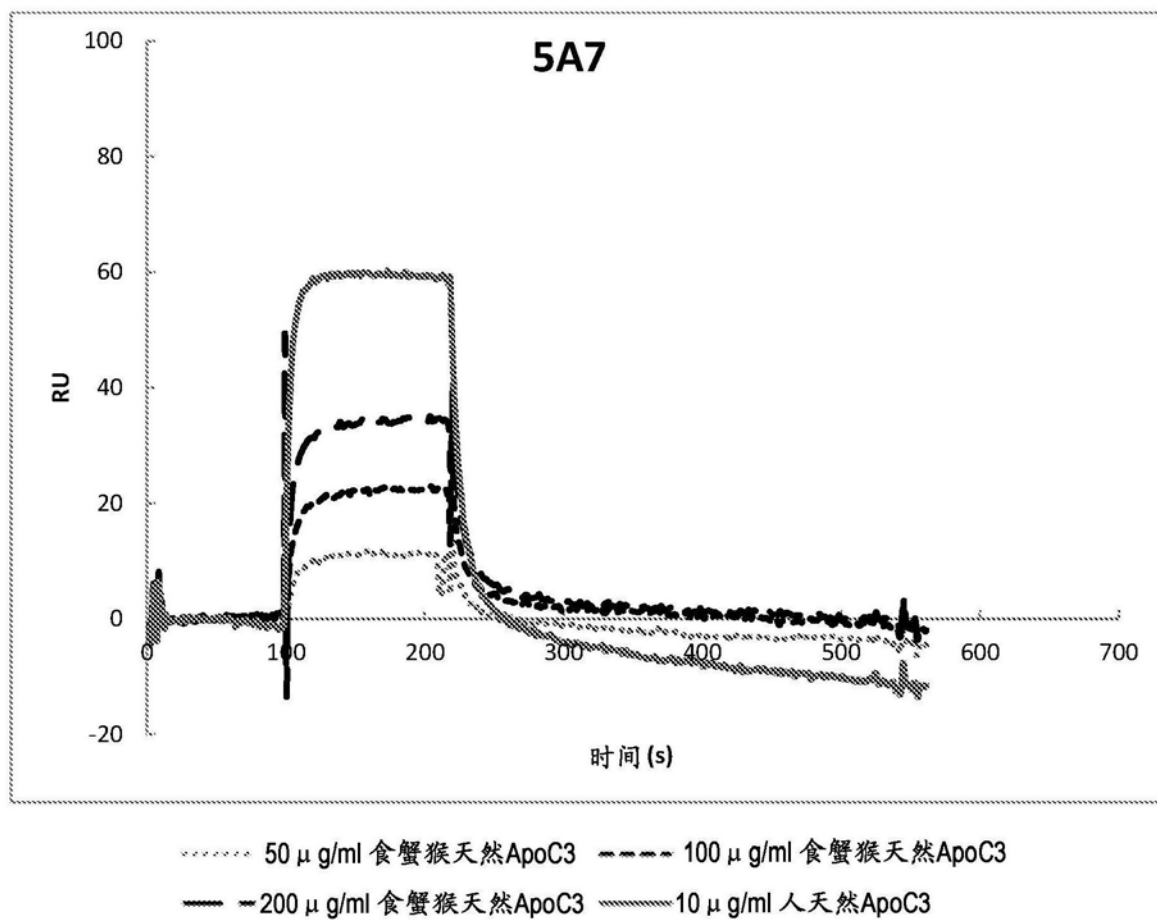
B

图5 (续)

C

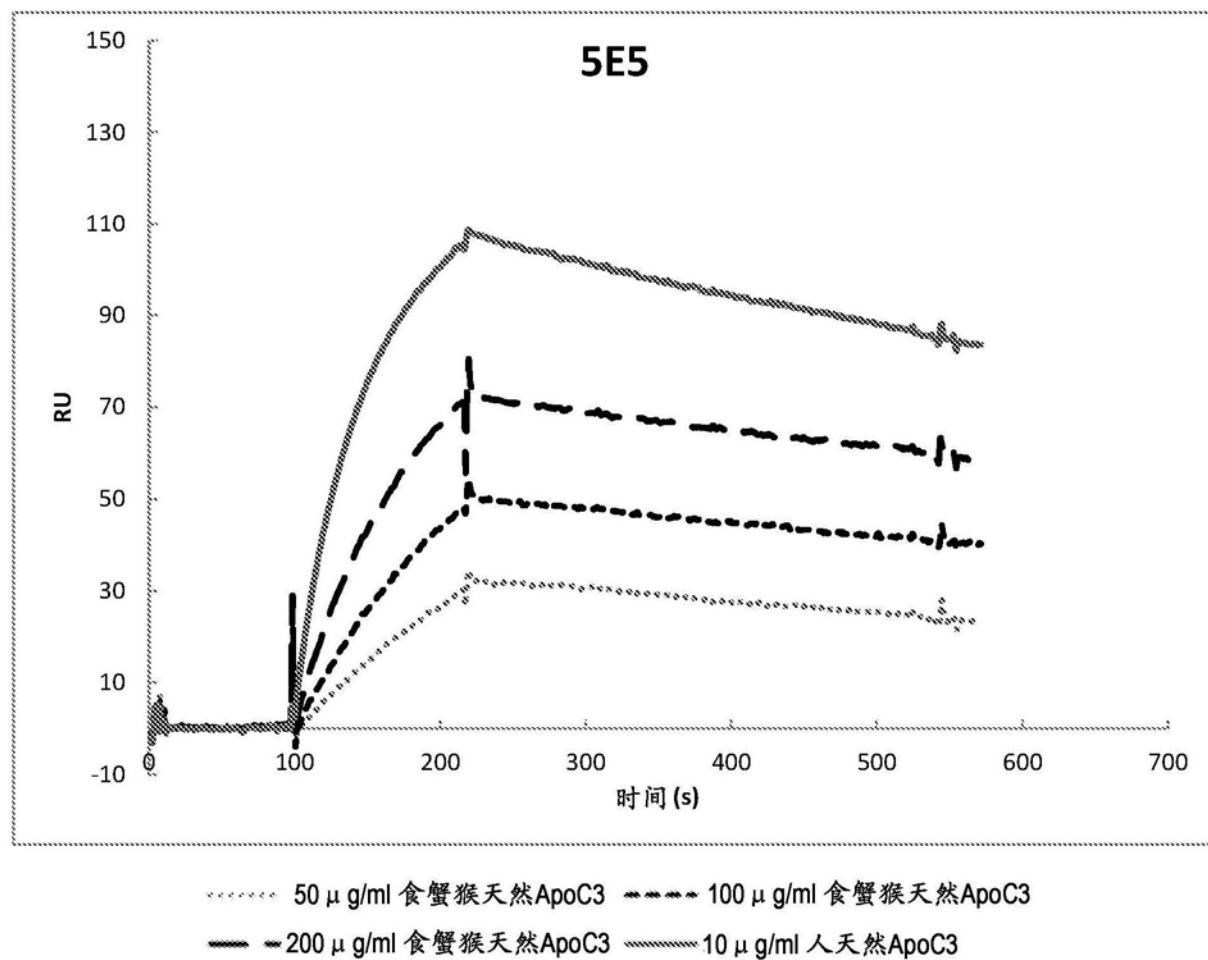


图5 (续)

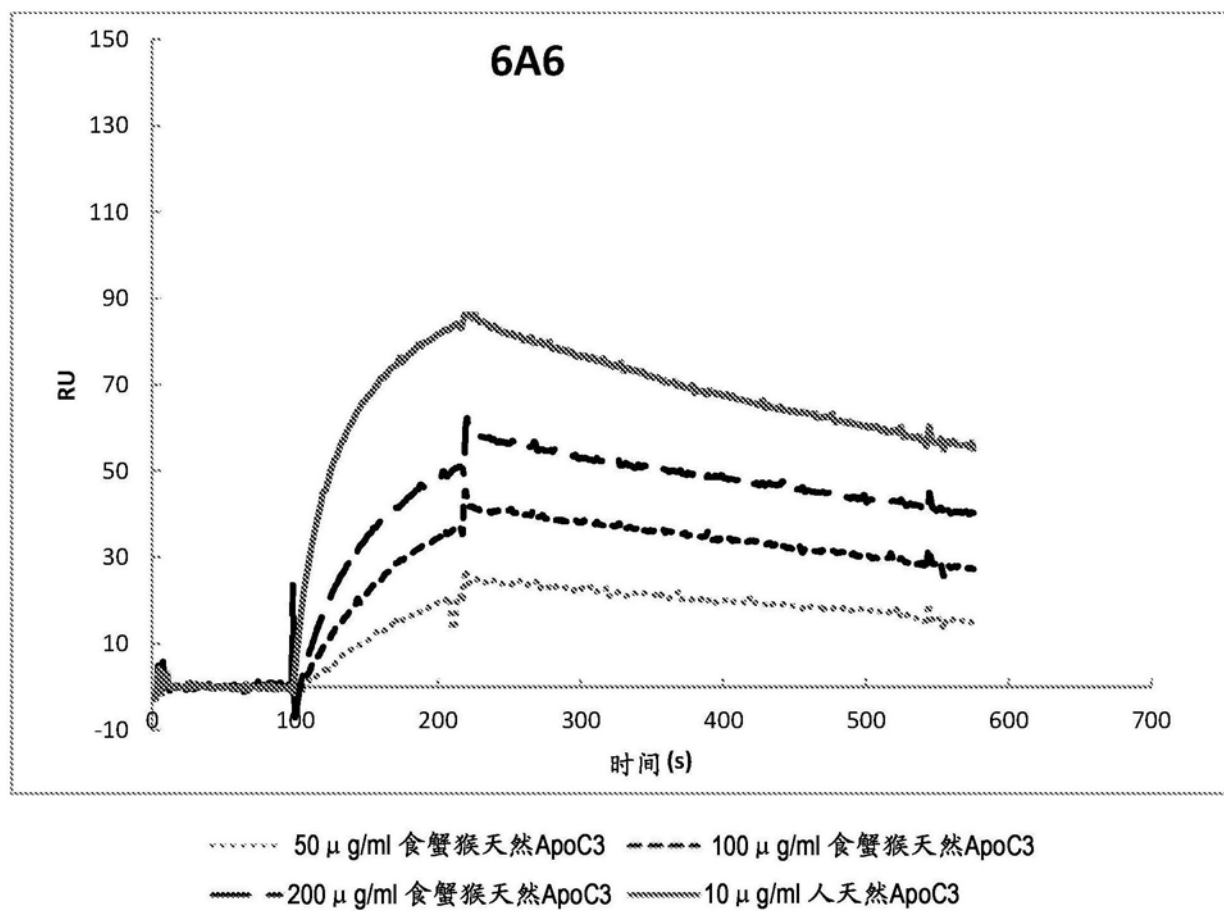
D

图5 (续)

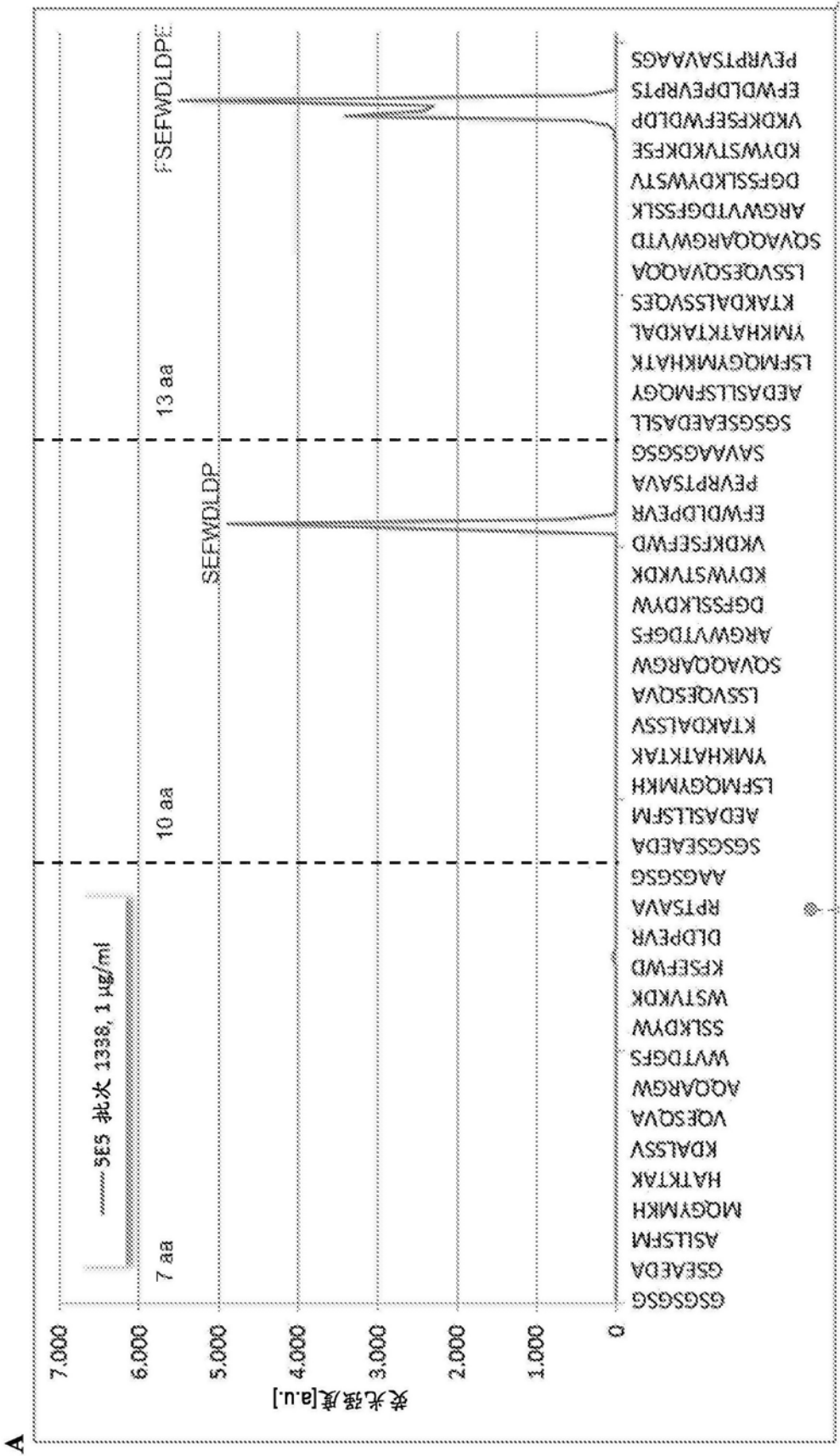


图6

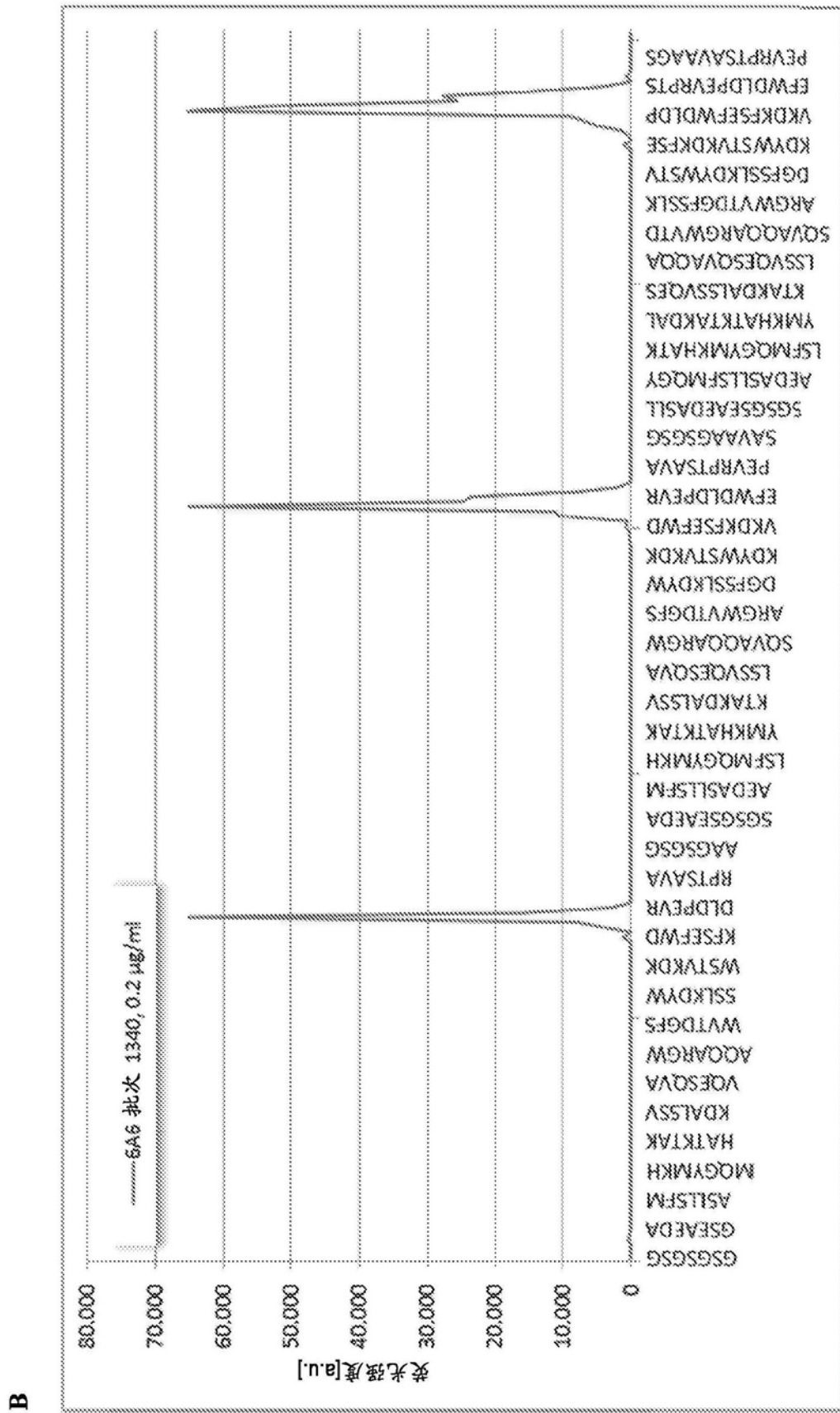


图6(续)

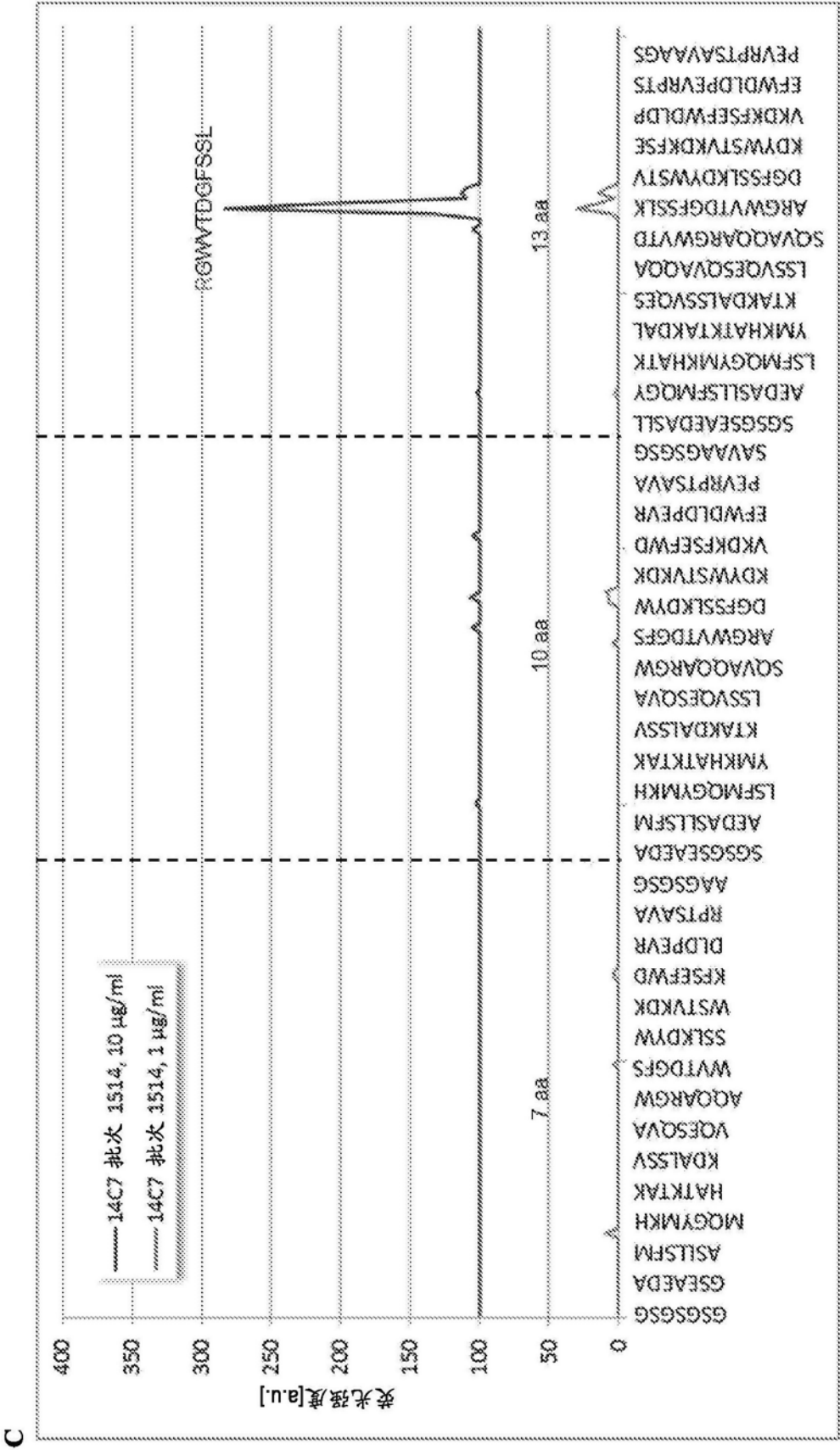


图6(续)

A

V	P	M	E	D	V	T	G	K	L	Y	Q	N	F	S	H	W	A	I	R	C
E	E	T	D	M	Q	I	K	L	V	S	P	Y	H	A	N	G	F	R	W	C
P	T	P	S	V	I	E	M	A	G	Q	D	K	R	N	L	Y	F	H	W	C
D	D	E	P	C	G	M	A	Q	T	S	Y	K	W	V	R	N	F	H	I	L
L	T	L	V	I	K	S	G	P	A	R	M	N	Q	H	W	D	E	F	Y	C
D	D	C	E	R	Y	W	V	T	S	Q	P	N	A	F	G	H	I	K	L	M
W	W	V	F	C	R	Y	T	S	Q	P	N	A	D	E	G	H	I	K	L	M
F	P	T	S	E	D	N	A	G	M	Q	L	Y	V	K	F	W	H	R	I	C
E	E	Y	A	P	F	H	S	Q	N	D	K	M	L	W	V	C	R	T	G	I
S	T	S	V	A	K	L	H	R	F	Q	G	I	Y	W	P	N	C	D	E	M
F	E	Y	F	Q	M	L	P	T	N	S	V	A	D	W	K	H	I	R	G	C
K	E	P	D	M	Q	T	S	N	G	A	H	R	L	I	V	K	C	Y	F	W
D	E	D	T	P	Q	C	G	S	M	W	H	N	Y	I	A	V	R	L	F	K

图7

B

V	E	D	P	G	M	C	V	N	T	Y	F	A	S	Q	L	H	W	K	I	R
E	E	D	F	Y	W	P	M	Q	I	T	G	L	S	A	V	N	H	R	C	K
P	E	T	P	D	F	I	S	V	A	Y	M	L	N	C	Q	K	H	R	G	W
D	D	E	C	T	R	S	Y	W	V	Q	P	N	A	F	G	H	I	K	L	M
L	I	T	L	V	M	S	F	K	Q	R	N	A	E	H	Y	D	W	C	G	P
D	D	E	C	F	K	M	Y	W	V	T	S	R	Q	P	N	A	G	H	I	L
W	E	S	D	T	W	N	F	G	Q	Y	A	V	I	M	L	H	C	P	R	K
F	P	E	D	T	S	G	A	N	Q	M	H	K	I	F	L	Y	V	R	C	W
E	P	E	D	Q	M	N	A	T	S	G	V	H	L	Y	I	F	C	K	R	W
S	T	I	N	Q	S	A	V	L	E	M	G	R	D	P	H	Y	K	C	F	W
F	Y	F	E	P	Q	L	M	T	N	V	I	H	A	S	K	R	W	D	G	C
K	E	P	S	D	T	M	Q	N	H	A	G	I	V	R	K	L	C	Y	F	W
D	E	P	I	T	D	Q	G	S	A	H	W	N	Y	R	C	L	V	F	M	K

图7(续)

C

K	K	R	S	T	M	A	F	G	Q	E	V	N	H	I	L	P	Y	W	C	D
L	L	F	W	I	V	K	M	Y	Q	T	S	R	P	N	A	C	D	E	G	H
S	S	T	K	A	M	F	R	V	H	Q	W	Y	P	N	C	D	E	G	I	L
S	E	M	S	K	T	A	D	C	N	Q	V	R	I	L	H	F	Y	G	W	P
F	F	Y	L	W	K	V	N	T	S	R	Q	P	A	C	D	E	G	H	I	M
G	G	N	H	F	R	K	Y	W	V	T	S	Q	P	A	C	D	E	I	L	M
D	D	A	E	K	M	Q	S	R	L	C	T	N	G	I	H	V	W	Y	P	F
T	T	V	N	I	S	H	L	Y	W	R	Q	P	A	C	D	E	F	G	K	M
V	L	Y	V	F	I	A	K	M	R	H	T	W	Q	P	S	N	C	G	D	E
W	L	F	S	T	Y	R	K	N	A	D	G	W	E	Q	M	C	H	V	I	P
G	G	E	N	Q	H	D	R	S	M	K	W	C	F	T	V	P	A	Y	L	I
R	R	Q	E	F	M	N	G	C	K	V	S	L	P	A	D	H	W	T	Y	I
A	P	Q	N	A	E	G	M	R	T	S	F	C	L	V	K	H	W	I	D	Y

图7(续)

A

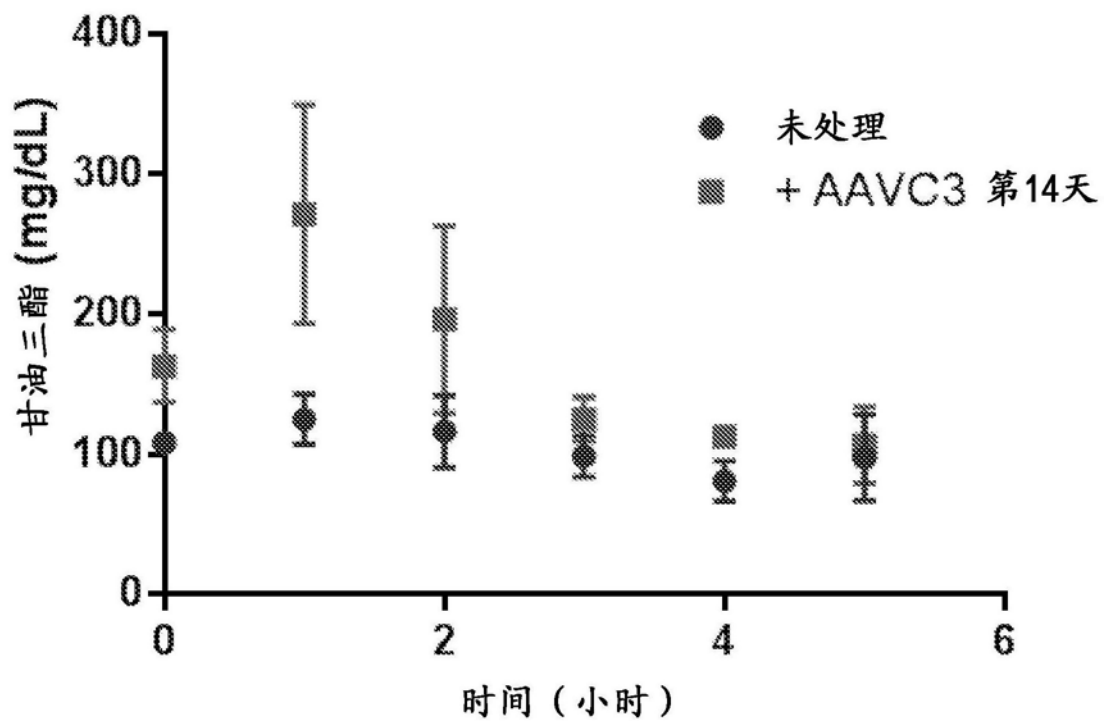


图8

B

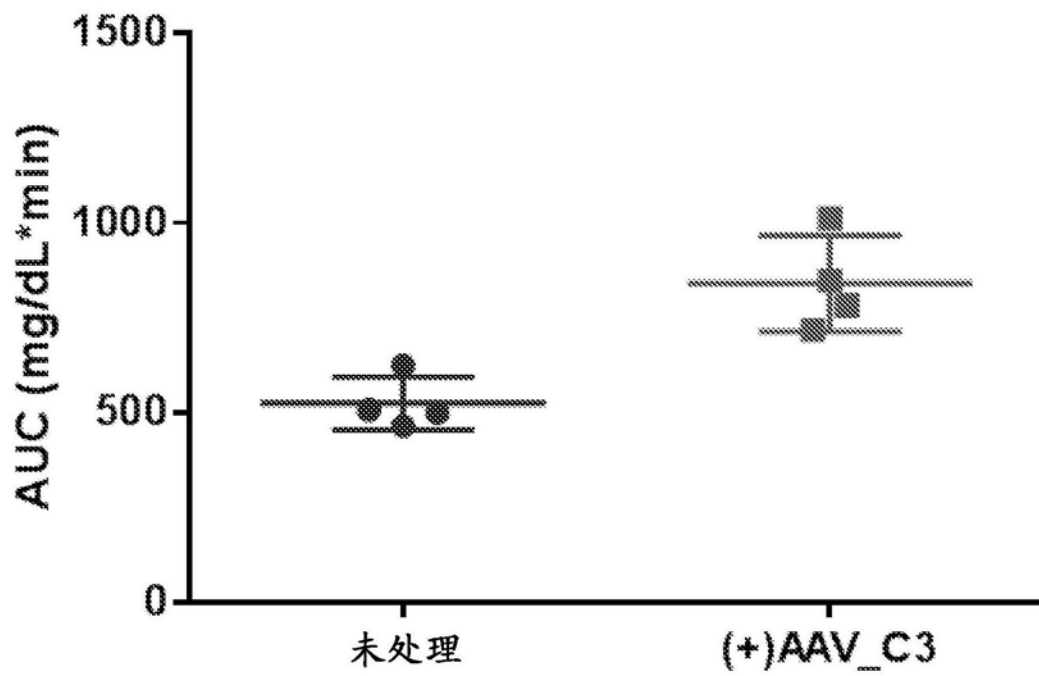


图8(续)

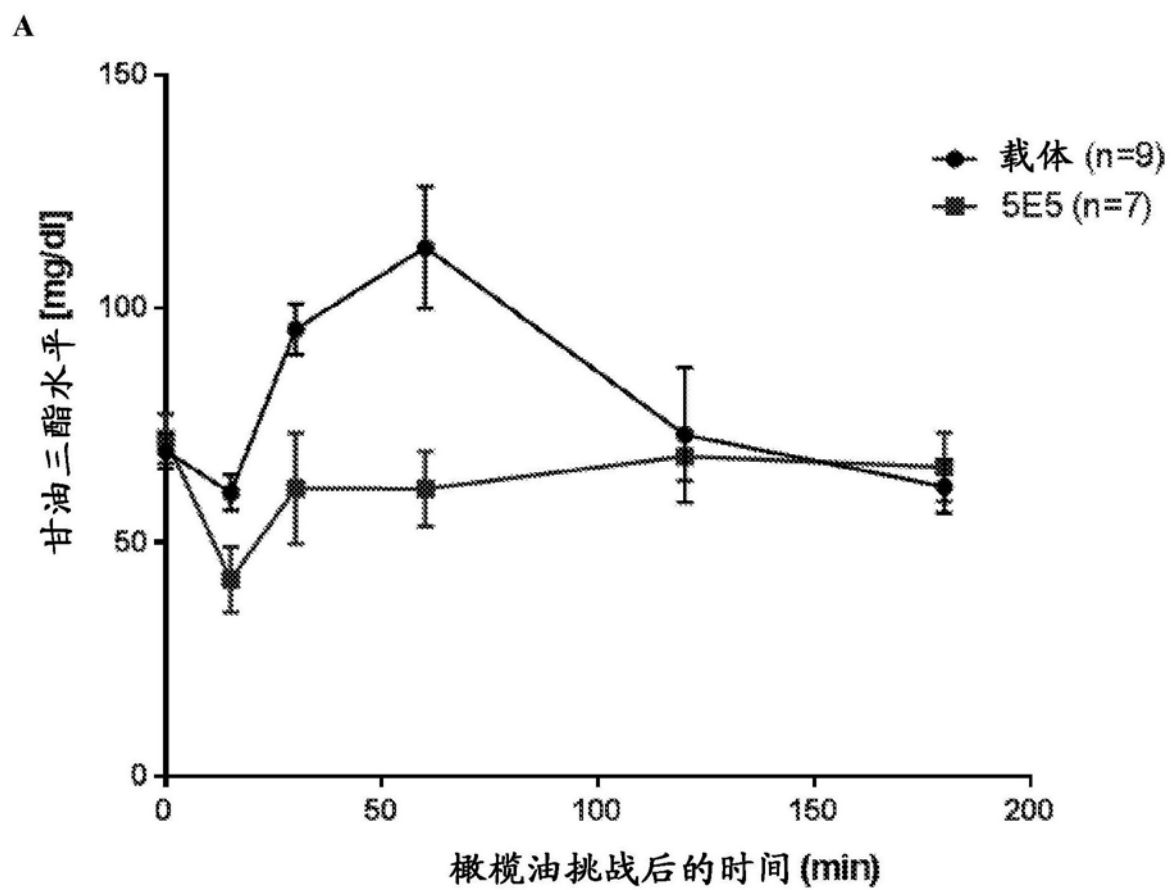


图9

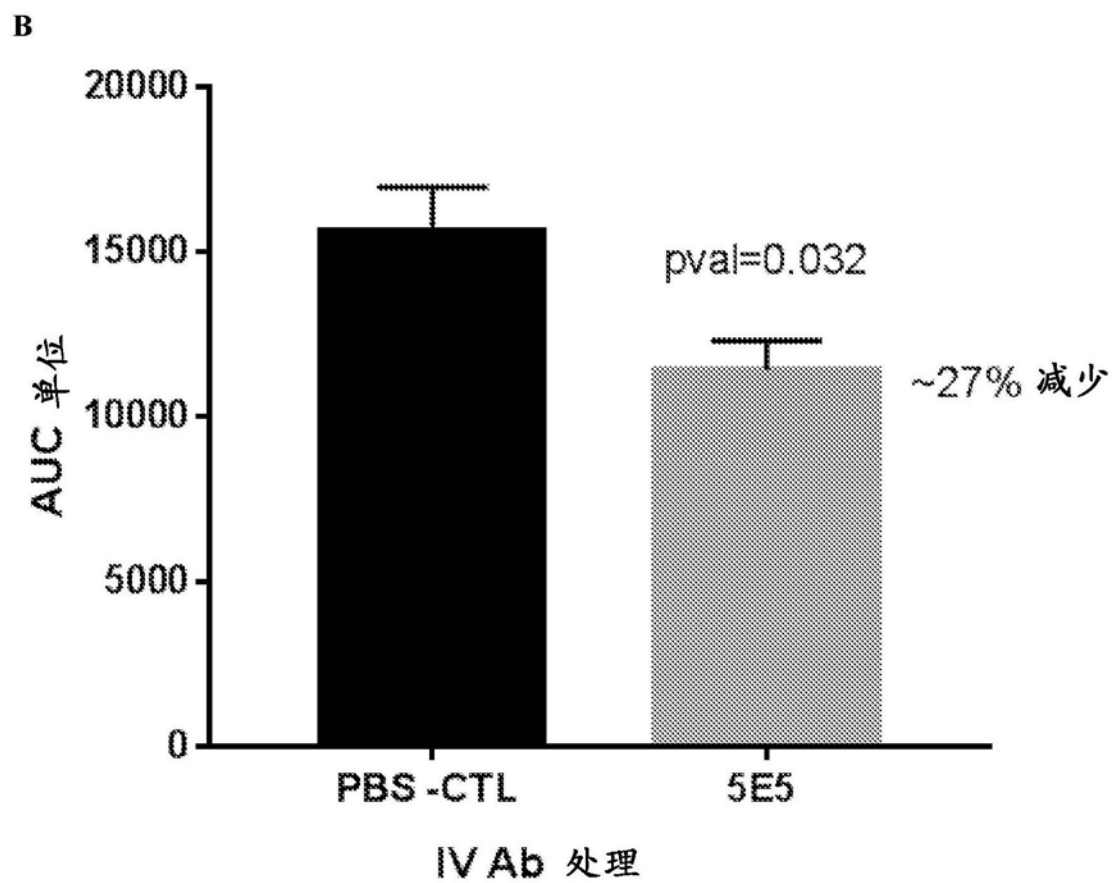


图9(续)

C

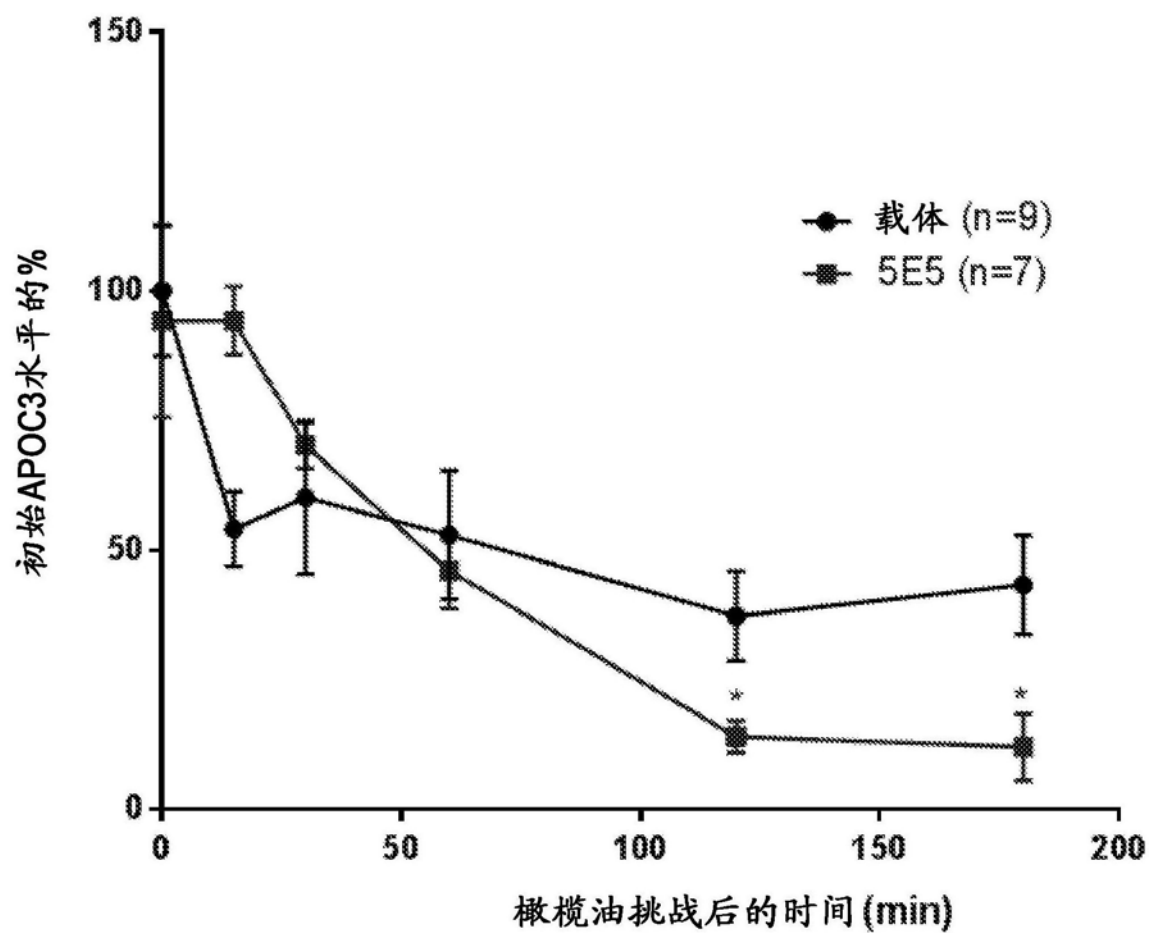


图9 (续)

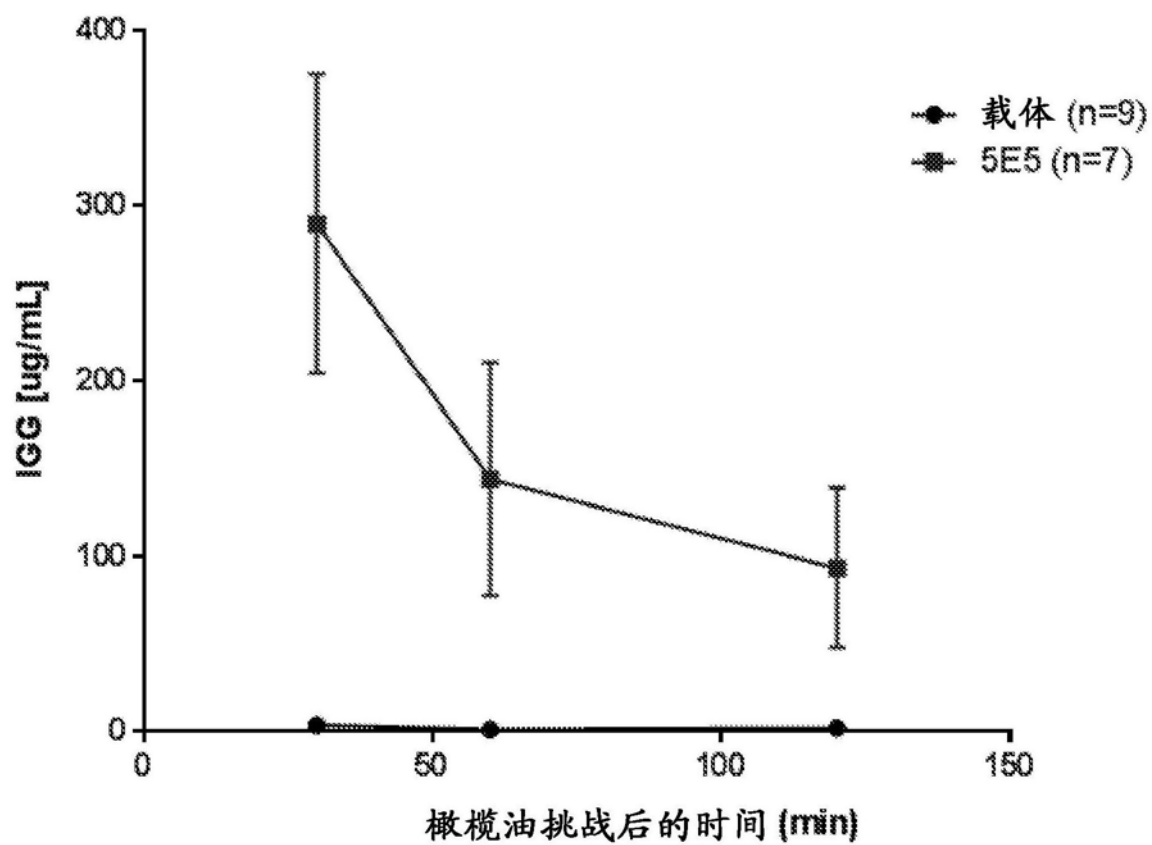
D

图9(续)

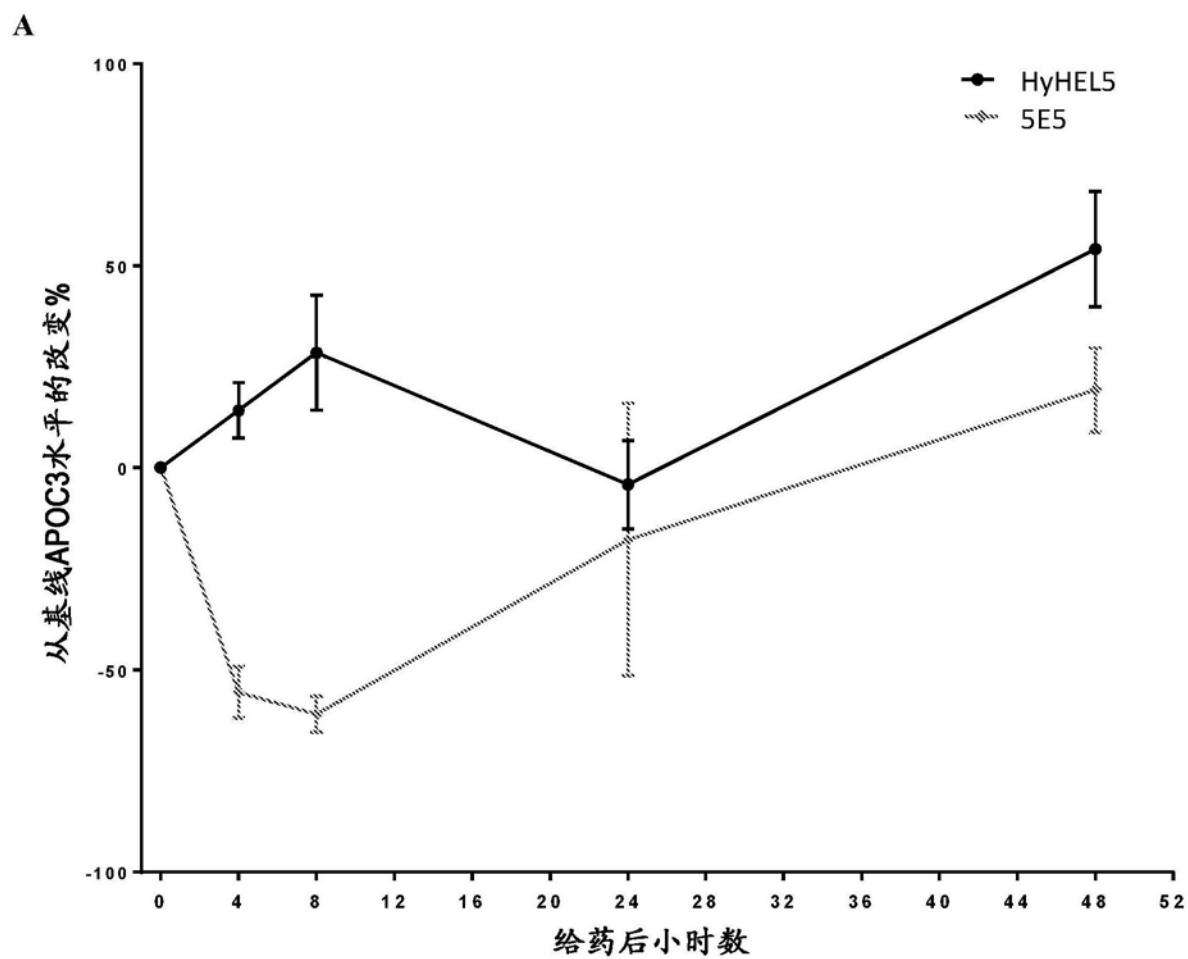


图10

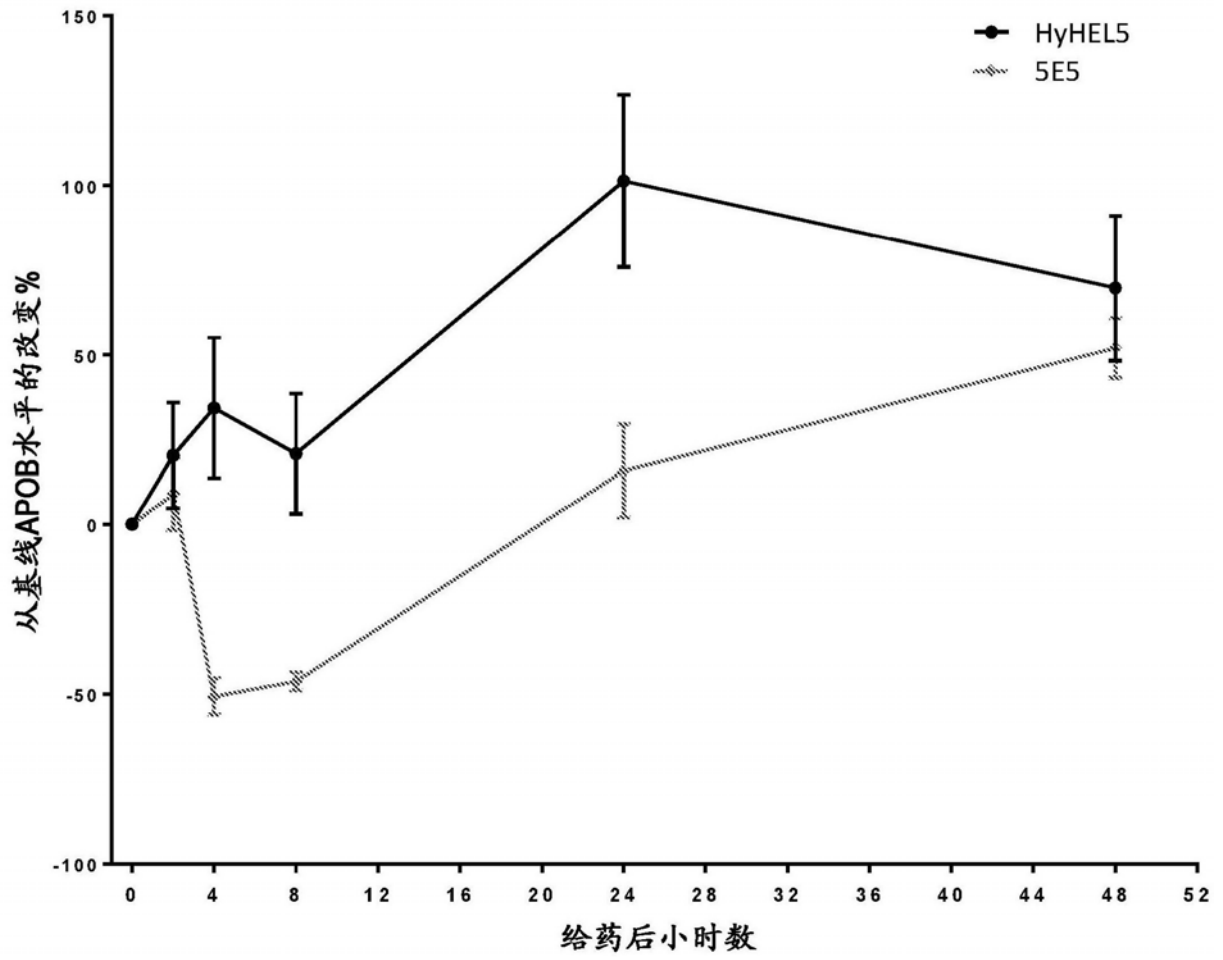
B

图10(续)

C

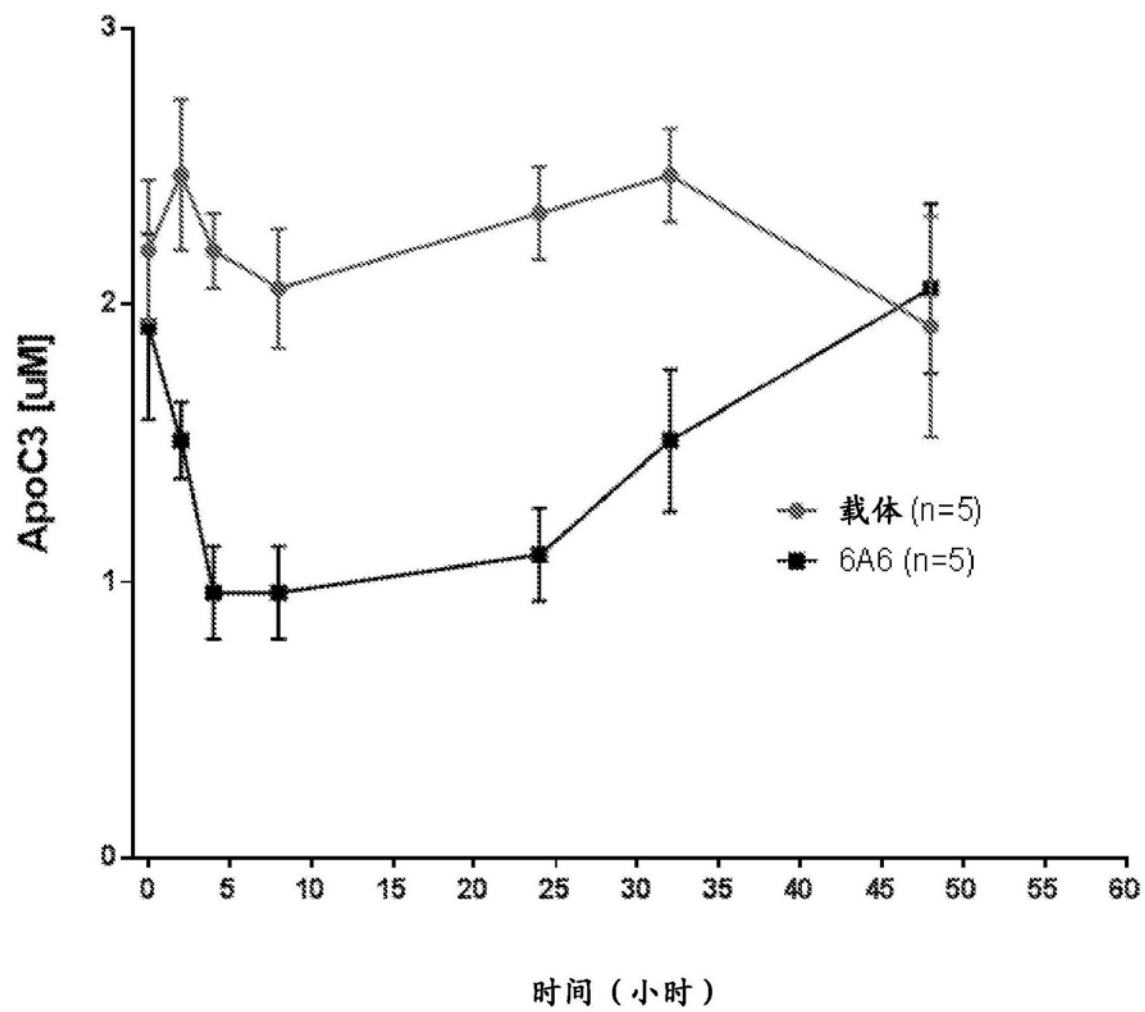


图10(续)

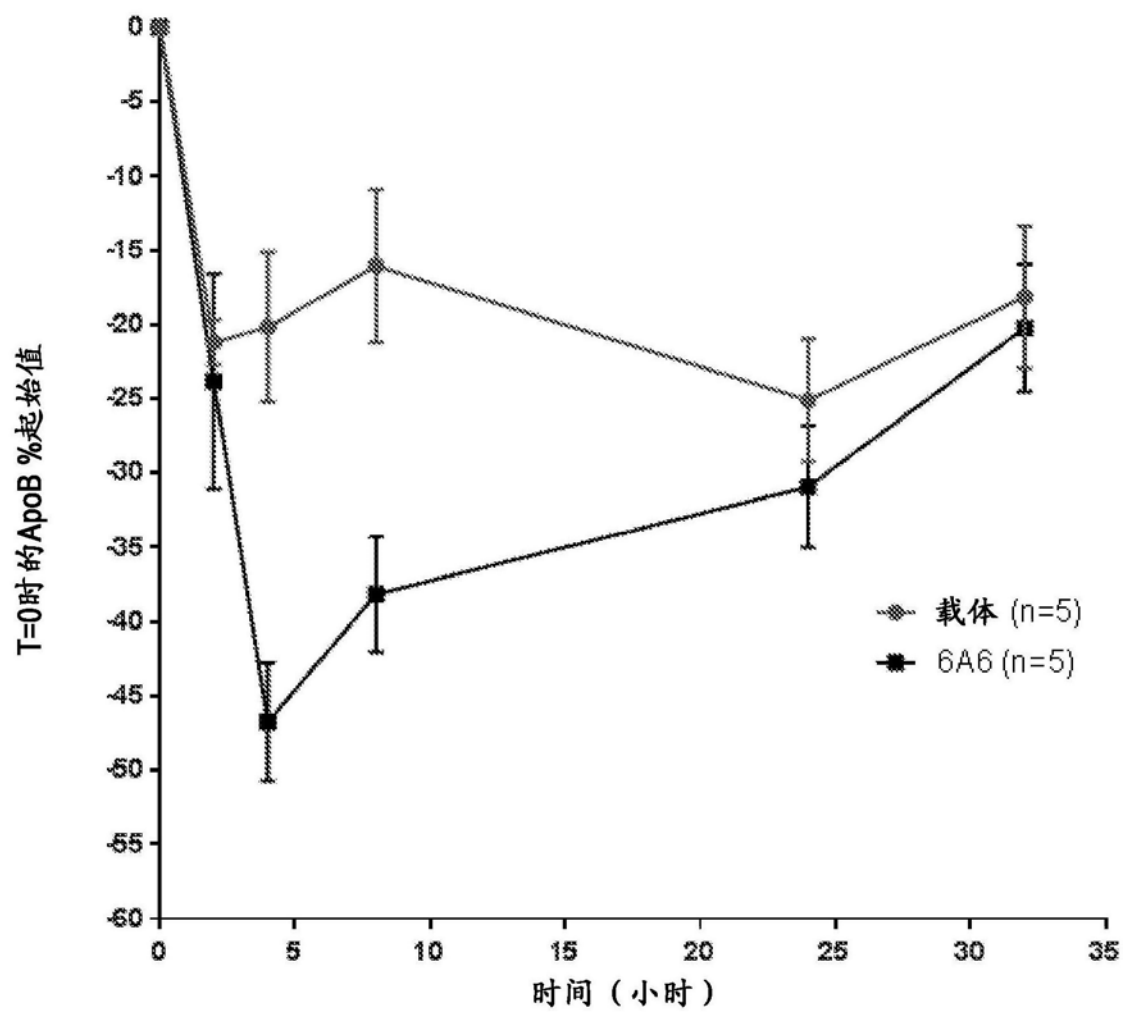
D

图10 (续)