República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020008514-6 A2

(22) Data do Depósito: 31/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 20/10/2020

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-APOC3 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/18; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 31/10/2017 US 62/579,449.

(71) Depositante(es): STATEN BIOTECHNOLOGY B.V..

(72) Inventor(es): PAUL DASILVA-JARDINE; HANS DE HAARD.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018058564 de 31/10/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/087115 de 09/05/2019

(85) Data da Fase Nacional: 29/04/2020

(57) Resumo: A presente divulgação provê anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (por exemplo, ApoC3 humano) e antagonizam a função de ApoC3. Também são providas composições farmacêuticas compreendendo esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para a preparação desses anticorpos, e métodos de tratamento de um indivíduo usando esses anticorpos.

Figura 1A

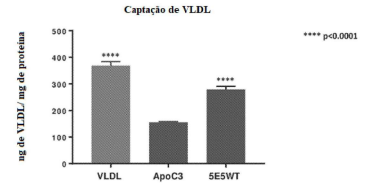
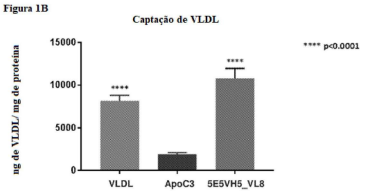


Figura 1B



ANTICORPOS ANTI-APOC3 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício dos Pedidos Provisórios U.S. 62/579.449, depositados em 31 de outubro de 2017, que são incorporados por referência nesse documento na sua totalidade.

CAMPO

[002] A presente divulgação se refere a anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e métodos de uso dos mesmos.

ANTECEDENTES

[003] Níveis elevados de triglicerídeos no sangue (hipertrigliceridemia) são um fator causal para aterosclerose e aumentam o risco de eventos cardiovasculares, tais como, morte cardiovascular, angina, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

[004] ApoC3 é uma proteína que circula em concentrações muito altas (maiores que 10 µM) no sangue, principalmente ligada à lipoproteína rica em triglicerídeos (TRL), remanescentes de TRL, e lipoproteína de alta densidade. ApoC3 parece ser um importante regulador dos níveis de triglicerídeos no sangue. Por exemplo, demonstrou-se que os níveis de ApoC3 em humanos se correlacionam positivamente com os níveis de triglicerídeos no sangue, com níveis elevados de ApoC3 associados à hipertrigliceridemia. Além disso, demonstrou-se que ApoC3 inibe a atividade da lipoproteína lipase (uma enzima que hidrolisa triglicerídeos em TRL), e também inibe a captação hepática de remanescentes de TRL, os quais causam elevação dos níveis sanguíneos de triglicerídeos.

[005] Várias terapias foram aprovadas para o tratamento da hipertrigliceridemia, tais como, fibratos, niacina e ácidos graxos ômega-3. No entanto, essas terapias são apenas modestamente eficazes na redução dos triglicerídeos plasmáticos. Consequentemente, existe uma necessidade na técnica de terapias melhoradas para reduzir os triglicerídeos plasmáticos.

SUMÁRIO

[006] A presente divulgação provê anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e inibem a função de ApoC3. Também são providas composições farmacêuticas compreendendo esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para a preparação desses anticorpos, e métodos de tratamento de um indivíduo usando esses anticorpos.

[007] Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nesse documento podem atenuar a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de TRL por hepatócitos e podem causar uma diminuição rápida e prolongada nos níveis séricos de ApoC3 e ApoB quando administrados a um indivíduo. Por conseguinte, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados são úteis para o tratamento e a prevenção de hipertrigliceridemia e doenças associadas (*por exemplo*, doença cardiovascular e pancreatite).

[008] Por conseguinte, em um aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 com uma primeira constante de dissociação (K_D) em pH 7,4 e com um segundo K_D em pH 5,5, em que a razão entre o segundo K_D e o primeiro K_D é pelo menos

cerca de 5, 10, 20 ou 50. Em certas modalidades, o primeiro K_D é menor que 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 ou 0,1 nM. Em certas modalidades, a meia-vida do anticorpo em um camundongo que expressa ApoC3 é de pelo menos cerca de 3, 7, 14, 21 ou 28 dias.

[009] Em certas modalidades, o anticorpo atenua a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de hepatócitos da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de aumentar a taxa de depuração de ApoC3 do sangue em um indivíduo. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de aumentar a taxa de depuração de ApoB do sangue em um indivíduo. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de reduzir o nível de ApoC3 no sangue de um indivíduo. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de reduzir o nível de ApoC3 no sangue de um indivíduo em pelo menos 40% por pelo menos 2 semanas. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de reduzir o nível de ApoB no sangue de um indivíduo. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de reduzir o nível de ApoB no sangue de um indivíduo em pelo menos 20% por pelo menos 2 semanas. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de inibir a lipemia pós-prandial em um indivíduo. Em certas modalidades, o anticorpo é capaz de se ligar à ApoC3 ligada a lipídios.

[0010] Em certas modalidades, o anticorpo se liga a um epítopo dentro da sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende pelo menos um dos aminoácidos na posição 2, 5, 6, 8, ou 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 5 e 6 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas

posições 2, 5, 6, e 8 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos na posição 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 6, 8 e 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 6 e 8 da SEQ ID NO: 2.

[0011] Em certas modalidades, o anticorpo (*por exemplo*, anticorpo humanizado) compreende uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3 e em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTX$_1$X$_2$GGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é G, E ou D, e X$_2$ é G ou A (SEQ ID NO: 87);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, em que X é D ou G (SEQ ID NO: 88);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AXGTYYPHT, em que X é Q ou H (SEQ ID NO: 8) e, opcionalmente, em que CDRH1, CDRH2 e CDRH3 do anticorpo não são SEQ ID NOs: 3, 9, 10 ; 3, 11, 10; 3, 9, 12; ou 3, 11, 12, respectivamente.

[0012] Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG

(SEQ ID NO: 38) ou SIHTEGGGTAYRDSVKG: SEQ ID NO: 39). Em certas modalidades, CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) ou KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40). Em certas modalidades, CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) ou AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

[0013] Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36, 10, 6, 7 e 14; 3, 37, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 6, 7 e 14; 3, 39, 10, 6, 7 e 14; ou 3, 37, 10, 40, 7 e 13, respectivamente. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada compreende sequências de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42-53. Em certas modalidades, a região variável da cadeia leve compreende sequências de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54-65. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, respectivamente, compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 42 e 54, 43 e 55, 44 e 56, 45 e 57, 46 e 58, 46 e 54, 47 e 58, 47 e 54, 48 e 58, 48 e 54, 49 e 59, 49 e 60, 50 e 59, 50 e 60, 51 e 61, 52 e 62, 53 e 62, 43 e 63, 44 e 64 ou 45 e 65.

[0014] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3 e em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR

(SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de $SIX_1TDGGGTAYRDSVKG$, em que X_1 é S ou H (SEQ ID NO: 4);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de X_2GYSD, em que X_2 é A ou H (SEQ ID NO: 5);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de $AX_3GTYYPHT$, em que X_3 é Q ou H (SEQ ID NO: 8),

e em que pelo menos um de X_1, X_2 e X_3 é H.

[0015] Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 11, 10, 6, 7 e 13; 3, 9, 12, 6, 7 e 13; 3, 9, 10, 6, 7 e 14; 3, 11, 10, 6, 7 e 14; 3, 9, 12, 6, 7 e 14; 3, 11, 12, 6, 7 e 13; ou 3, 11, 12, 6, 7 e 13, respectivamente. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada compreende sequências de aminoácidos selecionadas do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 16-18. Em certas modalidades, a região variável da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 20. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, respectivamente, compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NOs: 16 e 19, 17 e 19, 18 e 19, 15 e 20, 16 e 20, 17 e 20, ou 18 e 20, respectivamente.

[0016] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3, compreendendo uma região

variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTX$_1$X$_2$GGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é G, E ou D, e X$_2$ é G ou A (SEQ ID NO: 87);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, em que X é D ou G (SEQ ID NO: 88);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AXGTYYPHT, em que X é Q ou H (SEQ ID NO: 8).

[0017] Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38) ou SIHTEGGGTAYRDSVKG: SEQ ID NO: 39). Em certas modalidades, CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) ou KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40). Em certas modalidades, CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) ou AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13). Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36, 10, 6, 7 e 14; 3, 37, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 6, 7 e 14; 3, 39, 10, 6, 7 e

14; ou 3, 37, 10, 40, 7 e 13, respectivamente.

[0018] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 42-53.

[0019] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 54-65.

[0020] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, respectivamente, compreende as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 42 e 54, 43 e 55, 44 e 56, 45 e 57, 46 e 58, 46 e 54, 47 e 58, 47 e 54, 48 e 58, 48 e 54, 49 e 59, 49 e 60, 50 e 59, 50 e 60, 51 e 61, 52 e 62, 53 e 62, 43 e 63, 44 e 64 ou 45 e 65.

[0021] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3, compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIX$_1$TDGGGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é S ou H (SEQ ID NO: 4);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de X$_2$GYSD, em que X$_2$ é A ou H (SEQ ID NO: 5);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AX$_3$GTYYPHT, em que X$_3$ é Q ou H (SEQ ID NO: 8),

e em que pelo menos um de X1, X$_2$ e X$_3$ é H.

[0022] Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 11, 10, 6, 7 e 13; 3, 9, 12, 6, 7 e 13; 3, 9, 10, 6, 7 e 14; 3, 11, 10, 6, 7 e 14; 3, 9, 12, 6, 7 e 14; 3, 11, 12, 6, 7 e 13; ou 3, 11, 12, 6, 7 e 13, respectivamente.

[0023] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 16-18.

[0024] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 20.

[0025] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um

anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, respectivamente, compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 16 e 19, 17 e 19, 18 e 19, 15 e 20, 16 e 20, 17 e 20, ou 18 e 20, respectivamente.

[0026] Em certas modalidades de qualquer um dos aspectos anteriores, o anticorpo compreende adicionalmente uma região constante humana ou humanizada. Em certas modalidades, a região constante é uma variante de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina humana do tipo selvagem, e em que a região constante da cadeia pesada da imunoglobulina humana variante tem uma afinidade aumentada para o receptor Fc neonatal humano (FcRn) a pH 6 em relação à afinidade da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina humana do tipo selvagem para FcRn humano a pH 6. Em certas modalidades, a região constante é uma região constante da cadeia pesada de uma IgG humana. Em certas modalidades, a região constante é uma região constante da cadeia pesada de uma IgG_1, IgG_2 ou IgG_4 humana.

[0027] Em certas modalidades, a região constante compreende os aminoácidos K, F e Y nas posições 433, 434 e 436 da EU, respectivamente. Em certas modalidades, a região constante compreende os aminoácidos Y, T e E nas posições 252, 254 e 256 da EU, respectivamente. Em certas modalidades, a região constante compreende os aminoácidos L e S nas posições de EU 428 e 434, respectivamente. Em certas modalidades, a região constante compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID

NOs: 22-24, 76-78 e 81-86.

[0028] Em certas modalidades, o anticorpo isolado compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 66-73. Em certas modalidades, o anticorpo isolado compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 74. Em certas modalidades, o anticorpo isolado compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada e a cadeia leve, respectivamente, compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 66 e 74, 67 e 74, 68 e 74, 69 e 74, 70 e 74, 71 e 74, 72 e 74 ou 73 e 74, respectivamente.

[0029] Em outro aspecto, a presente divulgação provê uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo como divulgado nesse documento e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0030] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um polinucleotídeo que codifica a região variável da cadeia pesada ou a região variável da cadeia leve de um anticorpo, como divulgado nesse documento. Em outro aspecto, a presente divulgação provê um vetor de expressão compreendendo o polinucleotídeo como divulgado nesse documento. Em outro aspecto, a presente divulgação provê uma célula hospedeira compreendendo o vetor de expressão como divulgado nesse documento.

[0031] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para a produção de um anticorpo que se liga a ApoC3, o método que compreende a cultura da célula hospedeira, como divulgado nesse documento, sob condições que permitem a

expressão do anticorpo.

[0032] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para inibir a atividade de ApoC3 em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou uma composição farmacêutica como divulgado nesse documento. Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para reduzir os níveis de triglicerídeos no sangue de um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou uma composição farmacêutica, como divulgado nesse documento. Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para inibir a lipemia pós-prandial em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou uma composição farmacêutica como divulgado nesse documento. Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para o tratamento de hipertrigliceridemia em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou uma composição farmacêutica como divulgado nesse documento. Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para o tratamento de quilomicronemia em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou uma composição farmacêutica, como divulgado nesse documento.

[0033] Em outro aspecto, a presente divulgação provê um método para reduzir o risco de doença cardiovascular em um indivíduo com hipertrigliceridemia, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou uma composição farmacêutica, como divulgado

nesse documento. Em certas modalidades, a doença cardiovascular é infarto do miocárdio. Em certas modalidades, a doença cardiovascular é angina. Em certas modalidades, a doença cardiovascular é acidente cerebral vascular. Em certas modalidades, a doença cardiovascular é aterosclerose.

[0034] Em certas modalidades dos aspectos anteriores relacionados aos métodos de tratamento, o anticorpo reduz os níveis de quilomícron ou remanescentes de quilomícron no sangue do indivíduo. Em certas modalidades, o indivíduo está recebendo um agente redutor de lipídios adicional. Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios adicional é um inibidor de HMG-CoA redutase. Em certas modalidades, o inibidor da HMG-CoA redutase é atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina ou sinvastatina. Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios adicional é um inibidor de PCSK9. Em certas modalidades, o inibidor de PCSK9 é alirocumabe, evolocumabe ou bococizumabe. Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios adicional é a ezetimiba. Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios adicional é uma combinação de ezetimiba e um inibidor de HMG-CoA redutase. Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios adicional é uma combinação de ezetimiba, um inibidor de HMG-CoA redutase e um inibidor de PCSK9.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0035] As **Figuras 1A**, **1B e 1C** são uma série de gráficos que mostram que os anticorpos 5E5WT (Figura 1A), 5E5VH5_VL8 (Figura 1B) e 5E5VHWT_VL8 (“VL8”), 5E5VH12_VLWT (“VH12”), 5E5VH5_VLWT (“VH12”), e 5E5VH5_VL8 (“VH5_VL8”) (Figura 1C)

atenuaram a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) pelas células HepG2. As células HepG2 foram incubadas com VLDL em DiI e ApoC3 purificado isoladamente ou na presença de um anticorpo anti-ApoC3, como indicado. Os VLDL em DiI ingeridos pelas células HepG2 foram medidos por espectroscopia de fluorescência do corante DiI. As células HepG2 incubadas apenas com VLDL em DiI ("VLDL") serviram como controle positivo, e as células HepG2 incubadas com VLDL em DiI e ApoC3 purificado na ausência de um anticorpo anti-ApoC3 ("ApoC3") serviram como controle negativo.

[0036] A **Figura 2A** é um gráfico que mostra os níveis séricos em vários momentos após a injeção de dois anticorpos anti-ApoC3, 5E5 e 5E5VH5_VL8, e um anticorpo IgG_1 humano para lisossomo anti-ovo de galinha (HyHEL5), em um modelo de camundongo ApoC3 humano AAV8.

[0037] A **Figura 2B** é um gráfico que mostra o efeito de 5E5 e 5E5VH5_VL8 no nível de ApoC3 humano em circulação em um modelo de camundongo ApoC3 humano AAV8.

[0038] A **Figura 2C** é um gráfico que mostra o efeito de 5E5 e 5E5VH5_VL8 no nível de ApoB circulante em um modelo de camundongo ApoC3 humano AAV8.

[0039] A **Figura 3** é uma série de sensogramas de ressonância de plasmon de superfície (SPR) mostrando a cinética de ligação de vinte anticorpos anti-ApoC3 humanizados (mAb1 a mAb20) para ApoC3 humano, quando ApoC3 humano é imobilizado em um chip de biossensor. Os sensogramas com linhas pontilhadas e sólidas correspondem ao pH do ensaio de 7,4 e 5,5, respectivamente. Para referência, os sensogramas correspondentes a 5E5VH5_VL8 na concentração de

25nM estão incluídos em todos os gráficos (na linha tracejada em pH 7,4 e na linha tracejada em pH 5,5).

[0040] A **Figura 4** é uma série de sensogramas de SPR mostrando a cinética de ligação de vinte anticorpos humanos anti-ApoC3 (mAb1 a mAb20) ApoC3 humano, quando os anticorpos ApoC3 são imobilizados em um chip biossensor. Os sensogramas na linha pontilhada e na linha sólida correspondem ao pH do ensaio de 7,4 e 5,5, respectivamente. Para referência, os sensogramas correspondentes a 5E5VH5_VL8 na concentração alvo de nhuApoC3 de 600 nM estão incluídos em todos os gráficos (linha tracejada em pH 7,4 e linhas tracejadas longas em pH 5,5).

[0041] As **Figuras 5A-C** são um gráfico que mostra a porcentagem de atividade de anticorpos humanizados selecionados e 5E5VH5_VL8 após a incubação dos anticorpos nas temperaturas indicadas por 1 hora, em relação à atividade dos anticorpos correspondentes incubados a 4 °C por 1 hora. A atividade foi medida como a taxa de associação na Figura 5A, e foi medida como o valor máximo de RU (R0) nas Figuras 5B e 5C.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0042] A presente divulgação provê anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e inibem a função de ApoC3. Também são providas composições farmacêuticas compreendendo esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para a preparação desses anticorpos, e métodos de tratamento de um indivíduo usando esses anticorpos. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nesse documento podem atenuar a capacidade

de ApoC3 inibir a captação de TRL por hepatócitos e podem causar uma diminuição rápida e prolongada nos níveis séricos de ApoC3 e ApoB quando administrados a um indivíduo. Por conseguinte, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados são úteis para o tratamento e a prevenção de hipertrigliceridemia e doenças associadas (*por exemplo*, doença cardiovascular e pancreatite).

1. Definições

[0043] Como usado nesse documento, o termo "ApoC3" refere-se à proteína apolipoproteína C3. Em certas modalidades, o ApoC3 é ApoC3 humano. Uma sequência de aminoácidos ApoC3 humana de exemplo é apresentada no número de acesso RefSeq NP_000031.1. A sequência de aminoácidos madura de NP_000031.1 é como a seguir: SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLDPEVRPTSAVAA (SEQ ID NO: 1).

[0044] Como usado nesse documento, os termos "anticorpo" e "anticorpos" incluem anticorpos de comprimento total, fragmentos de ligação a antígeno de anticorpos de comprimento total, e moléculas compreendendo CDRs de anticorpos, regiões VH ou regiões VL. Exemplos de anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos produzidos de forma recombinante, anticorpos monoespecíficos, anticorpos multiespecíficos (incluindo anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, imunoglobulinas, anticorpos sintéticos, anticorpos tetraméricos compreendendo duas moléculas da cadeia pesada e duas da cadeia leve, um monômero de cadeia leve do anticorpo, um monômero de cadeia pesada do anticorpo, um dímero de cadeia leve do anticorpo, um dímero de cadeia

pesada do anticorpo, um par de cadeia leve do anticorpo-cadeia pesada do anticorpo, intracorpos, anticorpos heteroconjugados, anticorpos de domínio único, anticorpos monovalentes, anticorpos de cadeia única ou Fvs de cadeia (scFv), scFv-Fcs, anticorpos de camelídeos (*por exemplo*, anticorpos de lhama), anticorpos camelizados, corpos de alta afinidade, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, Fvs ligados a dissulfeto (sdFv), anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, *por exemplo*, anticorpos anti-anti-Id) e fragmentos de ligação a antígeno de qualquer um dos itens acima. Em certas modalidades, os anticorpos divulgados nesse documento referem-se a populações de anticorpos policlonais. Os anticorpos podem ser de qualquer tipo (*por exemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY), qualquer classe (*por exemplo*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 ou IgA_2) ou qualquer subclasse (*por exemplo*, IgG_{2a} ou IgG_{2b}) da molécula de imunoglobulina. Em certas modalidades, os anticorpos divulgados nessa descrição são anticorpos IgG, ou uma classe (*por exemplo*, IgG_1 ou IgG_4 humana) ou subclasse dos mesmos. Em uma modalidade específica, o anticorpo é um anticorpo monoclonal humanizado.

[0045] Como usado nesse documento, o termo “anticorpo isolado” refere-se a um anticorpo que foi identificado e separado e/ou recuperado de pelo menos um componente de seu ambiente natural. O termo “anticorpo isolado” inclui um anticorpo *in situ* dentro de uma célula hospedeira recombinante.

[0046] Como usado nesse documento, o termo “CDR” ou “região determinante da complementaridade” significa os sítios de combinação de antígenos não contíguos encontrados

na região variável de polipeptídeos das cadeias pesada e leve. Estas regiões particulares foram descritas por Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) e Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), de Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), e de MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), todos os quais são incorporados por referência na sua totalidade, onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparados entre si. Em certas modalidades, o termo "CDR" é uma CDR como definido por Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) e Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991). CDRH1, CDRH2 e CDRH3 denotam as CDRs da cadeia pesada e CDRL1, CDRL2 e CDRL3 denotam as CDRs da cadeia leve.

[0047] Como usado nesse documento, o termo "resíduos de aminoácidos de estrutura (FR)" refere-se aos aminoácidos na região de estrutura de uma cadeia de imunoglobulina. O termo "região estrutural" ou "região FR", como usado nessa descrição, inclui os resíduos de aminoácidos que fazem parte da região variável, mas não fazem parte das CDRs (*por exemplo*, usando a definição Kabat de CDRs).

[0048] Como usado nesse documento, os termos "região variável" e "domínio variável" são usados de forma intercambiável e são comuns na técnica. A região variável refere-se tipicamente a uma porção de um anticorpo, geralmente, uma porção de uma cadeia leve ou pesada, tipicamente sobre os aminoácidos 110 a 120 aminoácidos ou 110 a 125 aminoácidos na cadeia pesada madura e cerca de 90 a 115 aminoácidos na cadeia leve madura, que diferem extensivamente na sequência entre os anticorpos e são usados

na ligação e na especificidade de um anticorpo específico para seu antígeno específico. A variabilidade na sequência é concentrada naquelas regiões chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), enquanto as regiões mais altamente conservadas no domínio variável são chamadas regiões estruturais (FR). Sem desejar estar vinculado a qualquer mecanismo ou teoria particular, acredita-se que as CDRs das cadeias leve e pesada sejam as principais responsáveis pela interação e pela especificidade do anticorpo com o antígeno. Em certas modalidades, a região variável é uma região variável humana. Em certas modalidades, a região variável compreende CDRs de roedores ou murinos e regiões estruturais humanas (FRs). Em modalidades particulares, a região variável é uma região variável de primata (*por exemplo*, primata não humano). Em certas modalidades, a região variável compreende CDRs de roedores ou murinos e regiões estruturais (FRs) de primatas (*por exemplo*, primatas não humanos).

[0049] Os termos “VL” e “domínio VL” são usados de forma intercambiável para se referir à região variável da cadeia leve de um anticorpo.

[0050] Os termos “VH” e “domínio VH” são usados de forma intercambiável para se referir à região variável da cadeia pesada de um anticorpo.

[0051] Como usado nesse documento, os termos “região constante” e “domínio constante” são intercambiáveis e são comuns na técnica. A região constante é uma porção de anticorpo, *por exemplo*, uma porção terminal carboxila de uma cadeia leve ou pesada que não está diretamente envolvida na ligação de um anticorpo a antígeno, mas que pode exibir

várias funções efetoras, tal como interação com o receptor Fc. A região constante de uma molécula de imunoglobulina geralmente tem uma sequência de aminoácidos mais conservada em relação a um domínio variável da imunoglobulina.

[0052] Como usado nesse documento, o termo "cadeia pesada" quando usado em referência a um anticorpo pode se referir a qualquer tipo distinto, *por exemplo*, alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gama (γ) e mi (μ), com base na sequência de aminoácidos do domínio constante, que dá origem às classes de anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluindo subclasses de IgG, *por exemplo*, IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4.

[0053] Como usado nesse documento, o termo "cadeia leve" quando usado em referência a um anticorpo pode se referir a qualquer tipo distinto, *por exemplo*, capa (κ) ou lambda (λ) com base na sequência de aminoácidos dos domínios constantes. As sequências de aminoácidos da cadeia leve são bem conhecidas na técnica. Em modalidades específicas, a cadeia leve é uma cadeia leve humana.

[0054] Como usado nesse documento, o termo "posição da EU" refere-se à posição de aminoácidos de acordo com a convenção de numeração de EU para as regiões constantes de um anticorpo, como descrito em Edelman, G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) e Kabat *et al.*, em "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U.S. Dept. Health and Human Services, 5ª edição, 1991, cada uma das quais é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

[0055] Como usado nesse documento, o termo "liga-se especificamente a" refere-se à capacidade de um anticorpo se

ligar a um antígeno com uma constante de dissociação (K_D) menor que cerca de 1 x 10^{-6} M, 1 x 10^{-7} M , 1 x 10^{-8} M, 1 x 10^{-9} M, 1 x 10^{-10} M, 1 x 10^{-11} M, 1 x 10^{-12} M ou menos, ou ligar-se a um antígeno com uma afinidade que é duas vezes maior que sua afinidade para um antígeno não específico.

[0056] Como usado nesse documento, um “epítopo” refere-se a uma região localizada de um antígeno ao qual um anticorpo pode se ligar especificamente. Um epítopo pode ser, por exemplo, aminoácidos contíguos de um polipeptídeo (um epítopo linear ou contíguo) ou um epítopo pode, por exemplo, ser formado a partir de duas ou mais regiões não contíguas de um polipeptídeo ou polipeptídeos (um epítopo conformacional, não linear, descontínuo ou não contíguo). Em certas modalidades, o epítopo ao qual um anticorpo se liga pode ser determinado por, *por exemplo*, espectroscopia de RMN, estudos de cristalografia por difração de raios X, ensaios ELISA, troca de hidrogênio/deutério acoplada à espectrometria de massa (*por exemplo*, espectrometria de massa por eletropulverização por cromatografia líquida), ensaios de varredura de peptídeo. ou mapeamento de mutagênese (*por exemplo*, mapeamento de mutagênese direcionada ao sítio).

[0057] Como usado nesse documento, o termo “tratar”, “tratando” e “tratamento” refere-se a medidas terapêuticas ou preventivas divulgadas nesse documento. Os métodos de “tratamento” empregam a administração de um anticorpo anti-ApoC3 a um indivíduo tendo uma doença ou um distúrbio, ou predisposto a ter essa doença ou distúrbio, a fim de prevenir, curar, atrasar, reduzir a gravidade, reduzir o risco de desenvolver ou melhorar um ou mais de sintomas da

doença ou distúrbio ou doença ou distúrbio recorrente, ou a fim de prolongar a sobrevivência de um indivíduo além do esperado na ausência de tal tratamento.

[0058] Como usado nesse documento, o termo “quantidade eficaz” no contexto da administração de uma terapia a um indivíduo refere-se à quantidade de uma terapia que atinge um efeito profilático ou terapêutico desejado.

[0059] Como usado nesse documento, o termo “indivíduo” inclui qualquer animal humano ou não humano.

[0060] Como usado nesse documento, o termo “ou” significa e/ou.

[0061] Como usado nesse documento, os termos “cerca de” e “aproximadamente”, quando usados para modificar um valor numérico ou uma faixa numérica, indicam que desvios de 5% a 10% acima e 5% a 10% abaixo do valor ou da faixa permanecem dentro do significado pretendido do valor ou da faixa indicado(a).

2. Anticorpos Anti-ApoC3

[0062] A presente divulgação provê anticorpos isolados (*por exemplo*, anticorpos humanizados) que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e inibem a função de ApoC3.

[0063] Em certas modalidades, os anticorpos isolados se ligam à proteína ApoC3 de um mamífero. Em certas modalidades, os anticorpos isolados se ligam à ApoC3 humana. Em certas modalidades, os anticorpos isolados se ligam a *Macaca fascicularis* (macaco cynomolgus) ApoC3.

[0064] Em certas modalidades, os anticorpos isolados se ligam a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) com uma maior afinidade em pH fisiológico (*por exemplo*, pH 7,4) do que em

pH ácido (*por exemplo*, pH 5,5 a pH 6). Os métodos para gerar esses anticorpos dependentes de pH são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, em um método de exemplo, um ou mais de resíduos amino nas CDRs da cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo anti-ApoC3 é(são) substituído(s) por um resíduo de histidina, como descrito em: Igawa et al., Nat Biotechnol. (2010) 28(11):1203-1207; Chaparro-Riggers et al., J Biol Chem. (2012) 287(14):11090-11097; Número de patente US 9.096.651 e número de publicação de patente US US20110111406A1, no qual cada um dos quais é incorporado documento por referência nesse documento na sua totalidade. No entanto, embora esses métodos sejam bem conhecidos na técnica, o técnico qualificado entenderá que, para qualquer anticorpo específico, os aminoácidos de CDR precisas que podem ser mutados para histidina para alcançar a ligação dependente de pH ao antígeno sem interromper a afinidade do anticorpo para o antígeno só pode ser determinado empiricamente (ver, por exemplo, Edgcomb e Murphy, Proteins (2002) 49:1-6, no qual é aqui incorporado por referência nesse documento na sua totalidade).

[0065] Uma pessoa habilitada na técnica apreciaria que a afinidade de um anticorpo para um antígeno pode ser indicada pela constante de dissociação (K_D), em que uma K_D menor indica uma maior afinidade. Por conseguinte, em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 se ligam a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) com um primeiro K_D a pH 7,4 e com um segundo K_D a pH 5,5, em que a razão entre o segundo K_D e o primeiro K_D é pelo menos 1 (*por exemplo*, pelo menos 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 35; 40;

45; 50; 60; 70; 80; 90; ou 100).

[0066] Em certas modalidades, o primeiro K_D é menor que 100 nM (*por exemplo*, menor que 50; 20; 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2 ou 0,1 nM). Em certas modalidades, o segundo K_D é maior que 1 nM (*por exemplo*, maior que 2; 5; 10; 20 ou 50 nM ou maior que 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50; ou 100 µM). Em certas modalidades, o primeiro K_D é menor que 100 nM (*por exemplo*, menor que 50; 20; 10; 5; 2; 1; 0,5; 0,2 ou 0,1 nM) e a meia-vida do anticorpo em um animal (*por exemplo*, um humano ou um camundongo) que expressa ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) é de pelo menos cerca de 1 dia (*por exemplo*, pelo menos cerca de 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 dias ou maior que cerca de 1, 2, 3, 4, 6 ou 8 semanas). Em certas modalidades, o ApoC3 é ApoC3 humano, e o animal que expressa o ApoC3 é humano. Em certas modalidades, o ApoC3 é ApoC3 humano, e o animal que expressa o ApoC3 é um ApoC3 humano que expressa camundongo.

[0067] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição atenuam a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de TRL por hepatócitos (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL (*in vivo* ou *in vitro*). Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição atenuam a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de TRL por hepatócitos (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, como avaliado pelos métodos divulgados nesse documento ou por métodos conhecidos de um habilitado na técnica. Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição atenuam a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de hepatócitos de TRL (*por exemplo*, VLDL)

ou remanescentes de TRL em pelo menos cerca de 1,1 vezes; 1,2 vezes; 1,3 vezes; 1,4 vezes; 1,5 vezes; 2 vezes; 2,5 vezes; 3 vezes; 3,5 vezes; 4 vezes; 4,5 vezes; 5 vezes; 6 vezes; 7 vezes; 8 vezes; 9 vezes; 10 vezes; 15 vezes; 20 vezes; 30 vezes; 40 vezes; 50 vezes; 60 vezes; 70 vezes; 80 vezes; 90 vezes ou 100 vezes; como avaliado por métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos de um dos habilitados na técnica.

[0068] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição são capazes de inibir a lipemia pós-prandial em um indivíduo quando administrados ao indivíduo antes de, durante ou após uma refeição. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são capazes de inibir a lipemia pós-prandial no indivíduo em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou pelos métodos conhecidos por um habilitado na técnica. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são capazes de inibir a lipemia pós-prandial no indivíduo em pelo menos cerca de 1,1 vezes, 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou 100 vezes, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos de um habilitado na técnica.

[0069] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição são capazes de reduzir os níveis

de quilomícron ou remanescentes de quilomícron pós-prandial em um indivíduo quando administrado ao indivíduo antes de, durante ou após uma refeição. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são capazes de reduzir os níveis de quilomícron ou remanescente de quilomícron pós-prandial em um indivíduo em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, como avaliado pelos métodos divulgados nesse documento ou por métodos conhecidos de um habilitado na técnica. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são capazes de reduzir os níveis de quilomícron ou remanescentes de quilomícron pós-prandial em um indivíduo em pelo menos cerca de 1,1 vezes, 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou 100 vezes, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos de um dos habilitados na técnica.

[0070] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição são capazes de aumentar as taxas de depuração de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) do sangue em um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 são capazes de aumentar as taxas de depuração de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) do sangue em um indivíduo em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos

de um habilitado na técnica. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são capazes de aumentar as taxas de depuração de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) do sangue em um indivíduo em pelo menos cerca de 1,1 vezes, 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou 100 vezes, como avaliado pelos métodos divulgados nesse documento ou por métodos conhecidos dos habilitados na técnica. Os métodos para avaliar a depuração de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) incluem, sem limitação, as técnicas de rastreamento de isótopos, em que o isótopo pode ser radioativo ou estável.

[0071] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição são capazes de reduzir os níveis de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 são capazes de reduzir os níveis de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20% , 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos de um especialista na técnica. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são capazes de reduzir os níveis de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo em pelo menos cerca de 1,1 vezes, 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes,

3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou 100 vezes, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos dos habilitados na técnica. Em certas modalidades, a redução nos níveis de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue no indivíduo é mantida por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 dias, ou pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas.

[0072] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição são capazes de se ligar a ApoC3 ligado a lipídios (*por exemplo*, ApoC3 ligado a triglicerídeos, TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL). Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição não inibem a ligação de ApoC3 a um lipídeo ou lipoproteína. Em certas modalidades, os anticorpos divulgados nessa descrição não competem para a ligação de ApoC3 com um lipídio ou uma lipoproteína. Em certas modalidades, o lipídeo compreende uma cadeia de ácidos graxos. Em certas modalidades, o lipídeo compreende um grupo fosfatidil. Em certas modalidades, o lipídeo compreende uma fosfatidilcolina (*por exemplo*, DMPC), uma fosfatidilserina, uma fosfatidiletanolamina, um fosfatidilinositol ou um fosfatidilglicerol. Em certas modalidades, o lipídeo é um triglicerídeo. Em certas modalidades, a lipoproteína é um TRL (*por exemplo*, VLDL) ou um remanescente de TRL. Em certas modalidades, a capacidade de ApoC3 de se ligar a lipídios e lipoproteínas (*por exemplo*, triglicerídeos, TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL) na presença de um

anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento é de pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% da capacidade de ApoC3 de se ligar aos(às) mesmo(a)s lipídios e lipoproteínas na ausência de um anticorpo anti-ApoC3, como avaliado pelos métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos por um habilitado na técnica.

[0073] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição atenuam a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL por hepatócitos. Em certas modalidades, a captação de TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL por hepatócitos (*por exemplo*, células HepG2) na presença de um anticorpo anti-ApoC3, como divulgado nesse documento, é pelo menos 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 ou 5 vezes maior que a captação de TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL por hepatócitos (*por exemplo*, células HepG2) na ausência de um Anticorpo anti-ApoC3.

[0074] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição atenuam a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de TRL por hepatócitos (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL, e são capazes de se ligar a ApoC3 ligado a lipídios (*por exemplo*, ApoC3 ligado a triglicerídeos, TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL.

[0075] Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição se ligam a um epítopo de ApoC3 dentro da sequência de aminoácidos FSEFWDLDPE (SEQ ID NO: 2). Em certas modalidades, o epítopo compreende pelo menos

um aminoácido dentro da SEQ ID NO: 2 e, opcionalmente, compreende um ou mais aminoácidos da SEQ ID NO: 1 contíguos à SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende pelo menos um dos aminoácidos na posição 2, 5, 6, 8 ou 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende pelo menos dois dos aminoácidos na posição 2, 5, 6, 8 ou 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende pelo menos três aminoácidos na posição 2, 5, 6, 8 ou 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende pelo menos quatro aminoácidos na posição 2, 5, 6, 8 ou 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 5 e 6 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 2, 5 e 6 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 2, 5 e 8 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 2, 5, 6 e 8 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos na posição 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 6 e 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 8 e 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 6 e 8 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o epítopo compreende os aminoácidos nas posições 6, 8 e 10 da SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, os anticorpos são capazes de se ligar a ApoC3 ligado a lipídios (*por exemplo*, ApoC3 ligado a triglicerídeos, TRL (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL). Em certas modalidades, os anticorpos não são capazes de atenuar a capacidade de ApoC3 de inibir a lipólise de TRL

mediada por lipoproteína lipase (*por exemplo*, VLDL). Em certas modalidades, os anticorpos também atenuam a capacidade de ApoC3 de inibir a captação de TRL por hepatócitos (*por exemplo*, VLDL) ou remanescentes de TRL. Em certas modalidades, os anticorpos também são capazes de inibir a lipemia pós-prandial em um indivíduo quando administrado ao indivíduo antes de, durante ou após uma refeição. Em certas modalidades, os anticorpos divulgados nessa descrição também são capazes de reduzir os níveis de quilomícrons ou remanescentes de quilomícrons pós-prandial em um indivíduo, quando administrados ao indivíduo antes de, durante ou após uma refeição.

[0076] Quaisquer ensaios adequados podem ser usados para medir as atividades funcionais anteriores dos anticorpos divulgados nessa descrição. Ensaios de exemplo incluem os, mas não estão limitados aos ensaios funcionais divulgados nos Exemplos nesse documento.

[0077] As sequências de aminoácidos de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo são apresentadas nas Tabelas 1-13, nesse documento.

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de CDR da cadeia pesada de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo.

Clone de VH	**CDRH1**	**SEQ ID NO**	**CDRH2**	**SEQ ID NO**	**CDRH3**	**SEQ ID NO**
5E5VHWT	TYSMR	3	SISTDGGGTAYRDSVKG	9	AGYSD	10
5E5VH5	TYSMR	3	SIHTDGGGTAYRDSVKG	11	AGYSD	10
5E5VH12	TYSMR	3	SISTDGGGTAYRDSVKG	9	HGYSD	12
5E5VH5VH12	TYSMR	3	SIHTDGGGTAYRDSVKG	11	HGYSD	12

Tabela 2. Sequências de aminoácidos de CDR da cadeia leve de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo.

Clone de VL	CDRL1	SEQ ID NO	CDRL2	SEQ ID NO	CDRL3	SEQ ID NO
5E5VLWT	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
5E5VL8	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14

Tabela 3. Sequências de aminoácidos de VH de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo

Clone de VH	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID NO
5E5VHWT	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	15
5E5VH5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	16
5E5VH12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSS	17
5E5VH5VH12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSS	18

Tabela 4. Sequência de Aminoácidos de VL de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo.

Clone de VL	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID NO
5E5VLWT	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWF LQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISG VKAEDAGVYYCAQGTYYPHTFGSGTRLEIK	19
5E5VL8	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWF LQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISG VKAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGSGTRLEIK	20

Tabela 5. Sequência de VH e VL de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo.

Anticorpo	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
5E5WT	5E5VHWT	15	5E5VLWT	19
5E5VH5_VLWT	5E5VH5	16	5E5VLWT	19
5E5VH12_VLWT	5E5VH12	17	5E5VLWT	19
5E5VH5VH12_VLWT	5E5VH5VH12	18	5E5VLWT	19
5E5VHWT_VL8	5E5VHWT	15	5E5VL8	20
5E5VH5_VL8	5E5VH5	16	5E5VL8	20
5E5VH12_VL8	5E5VH12	17	5E5VL8	20
5E5VH5VH12_VL8	5E5VH5VH12	18	5E5VL8	20

Tabela 6. Sequências de regiões constantes da cadeia pesada e da cadeia leve de exemplo.

Região Constante	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
Região Constante de IgG1 Humana tipo selvagem	AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	21
Região Constante de IgG1 Humana tipo selvagem	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	75
Região Constante de IgG_1 Humano YTE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	22
Região Constante de IgG_1 Humano YTE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	76
Região Constante de IgG_1 Humano HNance	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE AL**KF**HYTQKSLSLSPGK	23

Região Constante	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
Região Constante de IgG_1 Humano HNance	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE AL**KF**HYTQKSLSLSPGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEAL**KF**HYTQKSLSLSPG	77
Região Constante de IgG_1 Humano Xtend	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEA LH**S**HYTQKSLSLSPGK	24
Região Constante de IgG_1 Humano Xtend	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEA LH**S**HYTQKSLSLSPG	78
Região Constante de IgG_4 Humano do tipo selvagem	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLGK	79
Região Constante S228P de IgG_4 Humano do tipo selvagem	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSLG	80

Região Constante	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
Região Constante S228P de IgG_4 Humano YTE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	81
Região Constante S228P de IgG_4 Humano YTE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLG	82
Região Constante S228P de IgG_4 Humano HNance	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL**K** **F**HYTQKSLSLSLGK	83
Região Constante S228P de IgG_4 Humano HNance	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALK FHYTQKSLSLSLG	84
Região Constante S228P de IgG_4 Humano Xtend	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV**L**HEALH **S**HYTQKSLSLSLGK	85
Região Constante S228P de IgG_4 Humano Xtend	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALH SHYTQKSLSLSLG	86
Região Constante de Igκ Humano	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	25

Região Constante	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
Região Constante de Igλ Humano	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	26

Tabela 7. Sequências completas da cadeia pesada e da cadeia leve de anticorpos anti-ApoC3 de exemplo.

Cadeia de anticorpo	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
5E5VH5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSIHTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	27
5E5VH5_ YTE	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSIHTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	28
5E5VH5_ HNance	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSIHTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL**KF**H YTQKSLSLSPGK	29

Cadeia de anticorpo	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
5E5VH5_ Xtend	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSIHTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**H YTQKSLSLSPGK	30
5E5VH12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSISTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	31
5E5VH12_ YTE	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSISTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	32
5E5VH12_ HNance	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSISTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL**KF**H YTQKSLSLSPGK	33

Cadeia de anticorpo	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
5E5VH12_ Xtend	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKALEWVSSISTD GGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGT QVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV**L**HEALH**S**H YTQKSLSLSPGK	34
5E5VL8_ cadeia de comprimento completo	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIY QVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGSGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	35

[0078] As sequências de aminoácidos de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo são apresentadas nas Tabelas 8-13, nesse documento.

Tabela 8. Sequências de aminoácidos de CDR da cadeia pesada de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo.

Clone de VH	**CDRH1**	**SEQ ID NO**	**CDRH2**	**SEQ ID NO**	**CDRH3**	**SEQ ID NO**
CDR de VH de consenso	TYSMR	3	SIHTX$_1$X$_2$GGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é G, E, ou D, e X$_2$ é G ou A	87	AGYSD	10
mAb7_VH	TYSMR	3	SIHTGGGGTAYRDSVKG	36	AGYSD	10
mAb1_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb2_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb3_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb4_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb5_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb6_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb8_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb9_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb10_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb11_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb12_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb13_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb14_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb15_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10

Clone de VH	CDRH1	SEQ ID NO	CDRH2	SEQ ID NO	CDRH3	SEQ ID NO
mAb16_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb17_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb18_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb19_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb20_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10

Tabela 9. Sequência de Aminoácidos de CDR da cadeia leve de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo.

Clone de VL	CDRL1	SEQ ID NO	CDRL2	SEQ ID NO	CDRL3	SEQ ID NO
VL CDR de consenso	KTSQGLVHSXGKTYFY, em que X é D ou G	88	QVSNRAS	7	AXGTYYPHT, em que X é Q ou H	8
mAb7_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb1_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb2_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb3_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb4_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb5_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb6_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb8_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb9_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb10_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb11_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb12_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb13_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb14_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb15_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
mAb16_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb17_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
mAb18_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb19_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
mAb20_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14

Tabela 10. Sequências de aminoácidos de VH de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo.

Clone de VH	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
VH de consenso	QLX$_1$ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFX$_2$TYSMRWVRQX$_3$PGKG LEWVSSIHTX$_4$X$_5$GGTAYRDSVKGRFTISRDNX$_6$KNTLYLQMNX$_7$ LX$_8$X$_9$EDTAX$_{10}$YYCVIAGYSDWGQGTX$_{11}$VTVSS, em que X$_1$ é V ou L; X$_2$ é G ou S; X$_3$ é V ou A; X$_4$ é G, E ou D; X$_5$ é G ou A; X$_6$ é A ou S; X$_7$ é S ou N; X$_8$ é R ou K; X$_9$ é A ou P; X$_{10}$ é I ou V; e X$_{11}$ é L ou Q	89
VH de consenso	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFX$_1$TYSMRWVRQX$_2$PGKG LEWVSSIHTX$_3$X$_4$GGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNX$_5$L X$_6$X$_7$EDTAX$_8$YYCVIAGYSDWGQGTX$_9$VTVSS, em que X$_1$ é G ou S; X$_2$ é V ou A; X$_3$ é G, E ou D; X$_4$ é G ou A; X$_5$ é S ou N; X$_6$ é R ou K; X$_7$ é A ou P; X$_8$ é I ou V; e X$_9$ é L ou Q	90
mAb1_VH, mAb2_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPGKGLE WVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAED TAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	46
mAb3_VH, mAb4_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAED TAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	47
mAb5_VH, mAb6_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	48
mAb7_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAED TAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	42

Clone de VH	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
mAb8_VH, mAb9_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTDAGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	49
mAb10_VH, mAb11_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQVPGKGLE WVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	50
mAb12_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQVPGKGLE WVSSIHTDAGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPED TAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	51
mAb13_VH	QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQVPGKGLE WVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	52
mAb14_VH	QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPGKGLE WVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	53
mAb15_VH, mAb16_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTEAGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLKAED TAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	43
mAb17_VH, mAb18_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTEAGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	44
mAb19_VH, mAb20_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLE WVSSIHTDAGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRPED TAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	45

Tabela 11. Sequências de Aminoácidos de VL de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo.

Clone de VL	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID NO
VL de consenso	DIVMTQSPX$_1$SLX$_2$VX$_3$PGESASISCKTSQGLVHSX$_4$GKTYFYWFLQKPGQS PQX$_5$LIYQVSNRASGVPDRFX$_6$GSGSGTDFTLKISX$_7$V X$_8$AEDX$_9$GVYYCAX$_{10}$GTYYPHTFGX$_{11}$GTRLEIK, em que X$_1$ é L ou G; X$_2$ é P ou S; X$_3$ é T ou V; X$_4$ é D ou G; X$_5$ é Q ou L; X$_6$ é S ou T; X$_7$ é R ou G; X$_8$ é K ou E; X$_9$ é A ou V; X$_{10}$ é H ou Q; e X$_{11}$ é Q ou S	91
VL de consenso	DIVMTQSPX$_1$SLX$_2$VX$_3$PGESASISCKTSQGLVHSX$_4$GKTYFYWFLQKPGQS PQQLIYQVSNRASGVPDRFX$_5$GSGSGTDFTLKISX$_6$V X$_7$AEDX$_8$GVYYCAX$_9$GTYYPHTFGX$_{10}$GTRLEIK, em que X$_1$ é L ou G; X$_2$ é P ou S; X$_3$ é T ou V; X$_4$ é D ou G; X$_5$ é S ou T; X$_6$ é R ou G; X$_7$ é K ou E; X$_8$ é A ou V; X$_9$ é H ou Q; e X$_{10}$ é Q ou S	92
mAb1_VL, mAb3_VL, mAb5_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVKAEDAGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	58
mAb2_VL, mAb4_VL, mAb6_VL, mAb7_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVKAEDAGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	54
mAb8_VL, mAb10_VL	DIVMTQSPLSLSVVPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	59
mAb9_VL, mAb11_VL	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	60
mAb12_VL	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVKAEDVGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	61

Clone de VL	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID NO
mAb13_VL, mAb14_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWYLQKPGQSPQL LIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	62
mAb15_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYYCAQGTYYPHT FGSGTRLEIK	63
mAb16_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYYCAHGTYYPHT FGSGTRLEIK	55
mAb17_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYYCAQGTYYPHT FGQGTRLEIK	64
mAb18_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	56
mAb19_VL	DIVMTQSPGSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVEAEDAGVYYCAQGTYYPHT FGQGTRLEIK	65
mAb20_VL	DIVMTQSPGSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFLQKPGQSPQQ LIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVEAEDAGVYYCAHGTYYPHT FGQGTRLEIK	57

Tabela 12. Sequência de VH e VL de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo.

Anticorpo	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
mAb1	mAb1_VH	46	mAb1_VL	58
mAb2	mAb2_VH	46	mAb2_VL	54
mAb3	mAb3_VH	47	mAb3_VL	58
mAb4	mAb4_VH	47	mAb4_VL	54
mAb5	mAb5_VH	48	mAb5_VL	58
mAb6	mAb6_VH	48	mAb6_VL	54
mAb7	mAb7_VH	42	mAb7_VL	54
mAb8	mAb8_VH	49	mAb8_VL	59
mAb9	mAb9_VH	49	mAb9_VL	60
mAb10	mAb10_VH	50	mAb10_VL	59
mAb11	mAb11_VH	50	mAb11_VL	60
mAb12	mAb12_VH	51	mAb12_VL	61
mAb13	mAb13_VH	52	mAb13_VL	62
mAb14	mAb14_VH	53	mAb14_VL	62
mAb15	mAb15_VH	43	mAb15_VL	63
mAb16	mAb16_VH	43	mAb16_VL	55
mAb17	mAb17_VH	44	mAb17_VL	64
mAb18	mAb18_VH	44	mAb18_VL	56

Anticorpo	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
mAb19	mAb19_VH	45	mAb19_VL	65
mAb20	mAb20_VH	45	mAb20_VL	57

Tabela 13. Sequências completas da cadeia pesada e da cadeia leve de anticorpos anti-ApoC3 humanizados de exemplo.

Cadeia de anticorpo	Sequência de Aminoácidos	SEQ ID NO
IgG_1 de cadeia pesada mAb7	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	66
IgG_1 de cadeia pesada mAb7 Xtend	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPG	67
IgG_1 de cadeia pesada mAb7 HNance	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPG	68
IgG_1 de cadeia pesada mAb7 YTE	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	69

Cadeia de anticorpo	**Sequência de Aminoácidos**	**SEQ ID NO**
IgG_4 de cadeia pesada mAb7 S228P	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	70
IgG_4 de cadeia pesada mAb7 S228P Xtend	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSLG	71
IgG_4 de cadeia pesada mAb7 S228P HNance	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALKFHYTQKSLSLSLG	72
IgG_4 de cadeia pesada mAb7 S228P YTE	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGKGLEWVSSIHTGGGGTAYRDSV KGRFTISRDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	73
$Ig\kappa$ de cadeia leve mAb7	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVKAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	74

[0079] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo um domínio VH compreendendo um, dois ou todos os três CDR(s) de um domínio VH apresentados na Tabela 3 ou 10 nesse

documento. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRH1 de um dos domínios VH apresentados na Tabela 3 ou 10. Em certas modalidades, o anticorpo compreende CDRH2 de um dos domínios VH apresentados na Tabela 3 ou 10. Em certas modalidades, o anticorpo compreende CDRH3 de um dos domínios VH apresentados na Tabela 3 ou 10.

[0080] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo um domínio VL compreendendo um, dois ou todos os três CDR(s) de um domínio VL divulgado na Tabela 4 ou 11 nesse documento. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRL1 de um dos domínios VL apresentados na Tabela 4 ou 11. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRL2 de um dos domínios VL apresentados na Tabela 4 ou 11. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRL3 de um dos domínios VL apresentados na Tabela 4 ou 11.

[0081] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos das regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3, respectivamente, de um conjunto de anticorpos apresentados nas Tabelas 5 ou 12.

[0082] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com Kabat *et al.*, J. Biol.

Chem. 252, 6609-6616 (1977) e Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest (1991). Em certas modalidades, as CDRs da cadeia leve de um anticorpo são determinadas de acordo com Kabat e as CDRs da cadeia pesada de um anticorpo são determinadas de acordo com MacCallum (*supra*).

[0083] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com o esquema de numeração de Chothia, que se refere à localização de alças estruturais de imunoglobulina (*ver*, *por exemplo*, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; e Patente U.S. Nº 7,709,226). Tipicamente, ao usar a convenção de numeração Kabat, o enovelamento de CDRH1 Chothia está presente nos aminoácidos da cadeia pesada 26 a 32, 33 ou 34, o enovelamento de CDRH2 Chothia está presente nos aminoácidos da cadeia pesada 52 a 56 e o enovelamento de CDRH3 Chothia está presente nos aminoácidos da cadeia pesada 95 a 102, enquanto o enovelamento de CDRL1 Chothia está presente nos aminoácidos da cadeia leve 24 a 34, o enovelamento de CDRL2 Chothia está presente nos aminoácidos da cadeia leve 50 a 56, e o enovelamento de CDRL3 Chothia está presente nos aminoácidos da cadeia leve 89 a 97. O final do enovelamento de CDRH1 Chothia quando numerado usando a convenção de numeração Kabat varia entre H32 e H34, dependendo do comprimento do enovelamento (isso ocorre porque o esquema de numeração Kabat coloca as inserções em H35A e H35B; se 35A e 35B não estiverem presentes, o enovelamento termina em 32; se apenas 35A estiver presente,

o enovelamento termina em 33; se 35A e 35B estiverem presentes, o enovelamento termina em 34).

[0084] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com o sistema de numeração IMGT, como descrito em Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7: 132-136 e Lefranc M-P *et al.*, (1999) Nucleic Acids Res 27: 209-212. De acordo com o esquema de numeração IMGT, CDRH1 está nas posições 26 a 35, CDRH2 está nas posições 51 a 57, CDRH3 está nas posições 93 a 102, CDRL1 está nas posições 27 a 32, CDRL2 está nas posições 50 a 52 e CDRL3 está nas posições 89 a 97.

[0085] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com o esquema de numeração AbM, que se refere a regiões hipervariáveis AbM, que representam um compromisso entre os enovelamentos estruturais Chothia e de CDRs Kabat e, são usadas pelo software de modelagem de anticorpo AbM de Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.).

[0086] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745. *Ver também*, *por exemplo*, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," em *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlim (2001).

[0087] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo as sequências de aminoácidos das regiões

CDRH1, CDRH2 e CDRH3 de um domínio VH apresentado na Tabela 3, e uma região variável da cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos das regiões CDRL1, CDRL2 e CDRL3 de um domínio VL apresentado na Tabela 4, em que cada CDR é definida independentemente de acordo com a definição Kabat, Chothia, IMGT, MacCallum ou AbM de uma CDR, conforme divulgado nesse documento.

[0088] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIX1TX2X3GGTAYRDSVKG, em que X_1 é S ou H, X_2 é G, E ou D e X_3 é G ou A (SEQ ID NO: 93);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de X4GYSD, em que X_4 é A ou H (SEQ ID NO: 5);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSX5GKTYFY, em que X_5 é D ou G (SEQ ID NO: 88);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AX6GTYYPHT, em que X_6 é Q ou H (SEQ ID NO: 8),

e em que pelo menos um de X_1, X_4 e X_6 é H.

[0089] Em certas modalidades, CDRH2 compreende a

sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39), SISTDGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 9), ou SIHTDGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 11).

[0090] Em certas modalidades, CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10) ou HGYSD (SEQ ID NO: 12).

[0091] Em certas modalidades, CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) ou KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40).

[0092] Em certas modalidades, CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) ou AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

[0093] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VH compreendendo as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36 e 10; 3, 37 e 10; 3, 38 e 10; 3, 39 e 10; 3, 9 e 10; 3, 11 e 10; 3, 9 e 12; ou 3, 11 e 12, respectivamente.

[0094] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VL compreendendo as sequências de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 6, 7 e 14; 40, 7 e 14; 40, 7 e 13; ou 6, 7 e 13, respectivamente.

[0095] Em certas modalidades, a presente divulgação

provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17 ou 18. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17, ou 18.

[0096] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19 ou 20. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19 ou 20.

[0097] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo

menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17 ou 18, e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19, ou 20. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17, ou 18, e uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19 ou 20.

[0098] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTX$_1$X$_2$GGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é G, E ou D, e X$_2$ é G ou A (SEQ ID NO: 87);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, em que X é D ou G (SEQ ID NO: 88);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AXGTYYPHT, em que X é Q ou H (SEQ ID NO: 8).

[0099] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), ou SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) ou KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de

AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) ou AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

[00100] Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), ou SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39). Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37) ou SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38). Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36). Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37). Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38). Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39).

[00101] Em certas modalidades, CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) ou KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40). Em certas modalidades, CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6). Em certas modalidades, CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40).

[00102] Em certas modalidades, CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) ou AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13). Em certas modalidades, CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14). Em certas modalidades, CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

[00103] Em certas modalidades, a presente divulgação

provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VH compreendendo as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36 e 10; 3, 37 e 10; 3, 38 e 10; ou 3, 39 e 10, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VH compreende as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36 e 10, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VH compreende as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 37 e 10, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VH compreende as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 38 e 10, respectivamente.

[00104] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VL compreendendo as sequências de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 6, 7 e 14; 40, 7 e 14; ou 40, 7 e 13, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VL compreende as sequências de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 6, 7 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VL compreende as sequências de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 40, 7 e 14, respectivamente.

[00105] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*,

ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo regiões CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve compreendendo regiões CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36, 10, 6 7 e 14; 3, 37, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 40, 7 e 14; 3, 39, 10, 6, 7 e 14; 3, 37, 10, 40, 7 e 13; ou 3, 38, 10, 40, 7 e 13, respectivamente. Em certas modalidades, as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36, 10, 6, 7 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 37, 10, 40, 7 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 38, 10, 40, 7 e 14, respectivamente.

[00106] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89 ou 90. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49,

50, 51, 52, 53, 89 ou 90. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 43. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 44. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 45. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 46. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 47. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 48. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 49. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 50. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 51. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 52. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos

apresentada na SEQ ID NO: 53. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 89, opcionalmente em que a região variável da cadeia pesada não compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 90, opcionalmente em que o a região variável da cadeia pesada não compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18.

[00107] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91 ou 92. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91 ou 92. Em certas modalidades, a o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 55. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo

a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 56. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 57. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 58. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 59. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 60. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 61. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 62. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 63. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 64. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 65. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência variável de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 91. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 92.

[00108] Em certas modalidades, a presente divulgação

provê um anticorpo isolado (*por exemplo*, um anticorpo humanizado) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89 ou 90, e uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91 ou 92. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89 ou 90, e uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91 ou 92. Em certas modalidades, a o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 42 e 54, 43 e 55, 44 e 56, 45 e 57, 46 e 58, 46 e 54, 47 e 58, 47 e 54, 48 e 58, 48 e 54, 49 e 59, 49 e 60, 50 e 59, 50 e 60, 51 e 61, 52 e 62, 53 e 62, 43 e 63, 44 e 64, 45 e 65, 89 e 91, ou 90 e 92, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 42 e 54,

respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 43 e 55, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 44 e 56, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 45 e 57, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 46 e 58, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 46 e 54, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 47 e 58, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 47 e 54, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 48 e 58, respectivamente. Em certas modalidades, o

anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 48 e 54, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 49 e 59, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 49 e 60, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 50 e 59, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 50 e 60, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 51 e 61, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 52 e 62, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 53 e 62, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região

variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 43 e 63, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 44 e 64, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 45 e 65, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 89 e 91, respectivamente, opcionalmente, em que a região variável da cadeia pesada não compreende o conjunto de sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 90 e 92, respectivamente, opcionalmente, em que a região variável da cadeia pesada não compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18.

[00109] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, e

em que:

(a) a CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) a CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIX$_1$TDGGGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é S ou H (SEQ ID NO: 4);

(c) a CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de X$_2$GYSD, em que X$_2$ é A ou H (SEQ ID NO: 5);

(d) a CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);

(e) a CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e/ou

(f) a CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AX$_3$GTYYPHT, em que X$_3$ é Q ou H (SEQ ID NO: 8).

[00110] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada tendo regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável da cadeia leve tendo regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, e em que:

(a) a CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) a CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIX$_1$TDGGGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é S ou H (SEQ ID NO: 4);

(c) a CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de X$_2$GYSD, em que X$_2$ é A ou H (SEQ ID NO: 5);

(d) a CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);

(e) a CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de

QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) a CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de $AX_3GTYYPHT$, em que X_3 é Q ou H (SEQ ID NO: 8),

e em que pelo menos um de X_1, X_2 e X_3 é H.

[00111] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo:

(a) uma CDRH1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

(b) uma CDRH2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 ou 11;

(c) uma CDRH3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ou 12;

(d) uma CDRL1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(e) uma CDRL2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; e/ou

(f) uma CDRL3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 ou 14.

[00112] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), o anticorpo compreendendo:

(a) uma CDRH1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

(b) uma CDRH2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 ou 11;

(c) uma CDRH3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ou 12;

(d) uma CDRL1 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(e) uma CDRL2 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; e

(f) uma CDRL3 compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 ou 14,

e em que o anticorpo isolado não compreende as sequências CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 9, 10, 6, 7 e 13, respectivamente.

[00113] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VH compreendendo as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 9 e 10; 3, 11 e 10; 3, 9 e 12; ou 3, 11 e 12, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VH compreende as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 11 e 10, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VH compreende as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 9 e 12, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VH compreende as sequências de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 11 e 12, respectivamente.

[00114] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VL compreendendo as sequências de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID

NOs: 6, 7 e 13; ou 6, 7 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, o domínio VL compreende as sequências de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 e CDRL3 apresentadas nas SEQ ID NOs: 6, 7 e 14, respectivamente.

[00115] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada compreendendo regiões CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável da cadeia leve compreendendo regiões CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 11, 10, 6, 7 e 13; 3, 9, 12, 6, 7 e 13; 3, 9, 10, 6, 7 e 14; 3, 11, 10, 6, 7 e 14; 3, 9, 12, 6, 7 e 14; 3, 11, 12, 6, 7 e 13; ou 3, 11, 12, 6, 7 e 13, respectivamente. Em certas modalidades, as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 11, 10, 6, 7 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 9, 12, 6, 7 e 14, respectivamente.

[00116] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica ao conjunto de sequências de aminoácidos na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18. Em certas

modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 16. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 17. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 18.

[00117] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica ao conjunto de sequências de aminoácidos descritas na SEQ ID NO: 19 ou 20. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 20.

[00118] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica ao conjunto de sequências de aminoácidos na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18, e uma região

variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% (*por exemplo*, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 19 ou 20. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 15, 16, 17 ou 18, e uma região variável da cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 19 ou 20. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 16 e 19, 17 e 19, 18 e 19, 15 e 20, 16 e 20, 17 e 20 ou 18 e 20, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 16 e 20, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve tendo as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 17 e 20, respectivamente.

[00119] Qualquer região constante de Ig pode ser usada nos anticorpos isolados divulgados nessa descrição. Em certas modalidades, a região constante de Ig é uma região constante da molécula de imunoglobulina (Ig) humana IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY, e/ou uma região constante de qualquer classe (*por exemplo*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2) ou qualquer subclasse (*por exemplo*, IgG_{2a} e IgG_{2b}) da molécula de imunoglobulina. Em certas modalidades, a região constante de Ig é uma região constante de Ig humana ou

humanizada.

[00120] Em certas modalidades, a região constante é uma variante de uma região constante da cadeia pesada de Ig humana do tipo selvagem (*por exemplo*, IgG), e em que a região constante da cadeia pesada de Ig humana variante tem uma afinidade aumentada (*por exemplo*, aumentada em pelo menos 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15 ou 20 vezes) para o receptor Fc neonatal humano (FcRn) a pH ácido (*por exemplo*, pH 5,5 a pH 6) em relação à afinidade da região constante da cadeia pesada de Ig humana do tipo selvagem correspondente para o FcRn humano sob as mesmas condições. Em certas modalidades, a região constante da cadeia pesada de Ig humana variante tem uma afinidade semelhante ou diminuída (*por exemplo*, aumentada em não mais que 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9 ou 2 vezes, igual a, ou diminuída) para o receptor Fc neonatal humano (FcRn) em pH fisiológico (*por exemplo*, em pH 7,4) em relação à afinidade da região constante da cadeia pesada de Ig humana do tipo selvagem para FcRn humano sob as mesmas condições. Em certas modalidades, a região constante compreende um, dois ou mais aminoácido(s) (*por exemplo*, tendo uma ou mais de substituições, inserções ou deleções) de um domínio constante de Ig do tipo selvagem (*por exemplo*, IgG) ou fragmento de ligação a FcRn do mesmo (*por exemplo*, um fragmento Fc ou domínio Fc-dobradiça). Em certas modalidades, a meia-vida do anticorpo com a região constante variante *in vivo* é aumentada em relação à meia-vida do anticorpo correspondente com o domínio constante do tipo selvagem ou fragmento de ligação a FcRn do mesmo *in vivo*. *Ver*, *por exemplo*, as Publicações Internacionais Nos WO

02/060919; WO 98/23289; e WO 97/34631; e Patentes U.S. Nos 5.869.046, 6.121.022, 6.277.375, 6.165.745, 8.088.376 e 8.163.881, todas incorporadas nesse documento por referência em sua totalidade, para exemplos de mutações que aumentarão a meia-vida de um anticorpo *in vivo*. Em certa modalidade, um ou mais aminoácido(s) diferente(s) está(estão) no segundo domínio constante (CH2) (resíduos 231-340 da IgG_1 humana) e/ou no terceiro domínio constante (CH3) (resíduos 341-447 da IgG_1 humana), numerados de acordo com o sistema de numeração de EU. Em certas modalidades, a região constante da IgG (*por exemplo*, IgG_1, IgG_2 ou IgG_4) de um anticorpo divulgado nesse documento compreende os aminoácidos tirosina (Y) treonina (T) e ácido glutâmico (E) nas posições 252, 254, e 256, respectivamente, numerados de acordo com o sistema de numeração de EU. *Ver* Patente U.S. Nº 7.658.921, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade. Este tipo de IgG, referido como "IgG YTE", mostrou mostrar meia-vida aumentada quatro vezes em comparação com as versões do tipo selvagem do mesmo anticorpo (ver Dall'Acqua WF *et al.*, (2006) J Biol Chem 281: 23514-24, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade). Em certas modalidades, a região constante da IgG (*por exemplo*, IgG_1) de um anticorpo divulgado nesse documento compreende o aminoácido alanina (A), serina (S), tirosina (Y) ou fenilalanina (F) na posição 434, numerada de acordo com o sistema de numeração de EU. Em certas modalidades, a região constante da IgG (*por exemplo*, IgG_1, IgG_2 ou IgG_4) de um anticorpo divulgado nesse documento compreende os aminoácidos lisina (K), fenilalanina (F) e tirosina (Y) nas posições 433, 434, e 436, respectivamente, numerados de acordo com o sistema de numeração de EU. Em

certas modalidades, a região constante da IgG (*por exemplo*, IgG_1, IgG_2 ou IgG_4) de um anticorpo divulgado nesse documento compreende os aminoácidos leucina (L) e serina (S) nas posições 428 e 434, respectivamente, numerados de acordo com o Sistema de numeração de EU. Regiões constantes de IgG adicionais que podem ter afinidade aumentada com FcRn sob condição ácida são descritas em Ward *et al.*, Mol. Immunol. (2015) 67(200):131-41, que é aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em certas modalidades, um anticorpo compreende um domínio constante de IgG compreendendo uma, duas, três ou mais de substituições de aminoácidos de resíduos de aminoácidos nas posições 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436, numeradas de acordo com o sistema de numeração de EU. Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição compreendem uma região constante da cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 ou 86. Em certas modalidades, os anticorpos isolados divulgados nessa descrição compreendem uma região constante da cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 25 ou 26.

[00121] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 ou 73. Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma cadeia leve compreendendo

a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 74. Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 66 e 74, 67 e 74, 68 e 74, 69 e 74, 70 e 74, 71 e 74, 72 e 74, ou 73 e 74, respectivamente.

[00122] Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34. Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 35. Em certas modalidades, a presente divulgação provê um anticorpo isolado que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), compreendendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve compreendendo as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 27 e 35, 28 e 35, 29 e 35, 30 e 35, 31 e 35, 32 e 35, 33 e 35, ou 34 e 35, respectivamente.

3. Métodos de Uso

[00123] ApoC3 inibe a captação e depuração de TRL (*por exemplo*, VLDL) e TRL remanescente por hepatócitos e inibe a lipólise de TRL mediada por lipoproteína lipase (*por exemplo*, VLDL), funcionando assim para aumentar os níveis de triglicerídeos no sangue de um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição podem atenuar a capacidade de ApoC3 de inibir o

TRL (*por exemplo*, VLDL) e a captação e depuração de remanescente de TRL por hepatócitos ou atenuar a capacidade de ApoC3 de inibir a lipólise de TRL mediada por lipoproteína (*por exemplo*, VLDL). Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para inibir a atividade de ApoC3 no sangue de um sujeito, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. Em certas modalidades, a atividade de ApoC3 é a inibição de TRL (*por exemplo*, VLDL) e captação e depuração de remanescentes de TRL por hepatócitos. Em certas modalidades, a atividade de ApoC3 é a inibição da lipólise de TRL mediada por lipoproteína lipase. Em certas modalidades, a atividade de ApoC3 é a inibição de TRL (*por exemplo*, VLDL) e captação e depuração de remanescentes de TRL por hepatócitos e inibição da lipólise de TRL mediada por lipoproteína lipase.

[00124] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são úteis para aumentar a taxa de depuração de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) do sangue em um indivíduo. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para aumentar a taxa de depuração de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) do sangue em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento.

[00125] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são úteis para reduzir o nível de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo.

Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para reduzir o nível de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. Em certas modalidades, o método reduz o nível de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, como avaliado por métodos divulgados nesse documento ou por métodos conhecidos por um habilitado na técnica. Em certas modalidades, o método reduz os níveis de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue de um indivíduo em pelo menos cerca de 1,1 vezes, 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou 100 vezes, como avaliado por métodos divulgados nessa descrição ou por métodos conhecidos de um dos habilitados na técnica. Em certas modalidades, a redução nos níveis de ApoC3 e/ou ApoB (*por exemplo*, ApoB48 e/ou ApoB100) no sangue no indivíduo é mantida por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 dias ou pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas.

[00126] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são úteis para reduzir os níveis de triglicerídeos no sangue de um indivíduo. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para

reduzir os níveis de triglicerídeos no sangue de um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento.

[00127] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são úteis para o tratamento de hipertrigliceridemia. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para o tratamento de hipertrigliceridemia em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. Em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para o tratamento de quilomicronemia em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. Em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para o tratamento da síndrome de quilomicronemia em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento.

[00128] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são úteis para o tratamento e a prevenção de lipemia pós-prandial em um indivíduo. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para inibir a lipemia pós-prandial em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição

farmacêutica divulgado(a) nesse documento. O anticorpo anti-ApoC3 pode ser administrado ao indivíduo antes, durante ou após uma refeição.

[00129] Sem desejar estar vinculado à teoria, os Requerentes acreditam que, em certas modalidades, os anticorpos divulgados nessa descrição são capazes de reduzir os níveis de quilomícrons ou remanescentes de quilomícron pós-prandiais em um indivíduo quando administrados ao indivíduo antes, durante, ou depois de uma refeição. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para reduzir os níveis de quilomícrons ou de remanescentes quilomícrons pós-prandiais em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. O anticorpo anti-ApoC3 pode ser administrado ao indivíduo antes, durante ou após uma refeição.

[00130] A redução dos níveis de triglicerídeos no sangue em pacientes com hipertrigliceridemia pode reduzir o risco de desenvolvimento de pancreatite. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para reduzir o risco de pancreatite em um indivíduo com hipertrigliceridemia, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento.

[00131] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição são úteis para reduzir o risco de doença cardiovascular em um indivíduo. Por conseguinte, em certas modalidades, a presente divulgação provê um método para

reduzir o risco de doença cardiovascular em um indivíduo com hipertrigliceridemia, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. O risco de desenvolver qualquer doença cardiovascular associada a, ou causada por, hipertrigliceridemia ou lipemia pós-prandial excessiva pode ser reduzido pela administração de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. As doenças cardiovasculares para as quais o risco pode ser reduzido incluem, sem limitação, doença arterial coronariana, aterosclerose, angina, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral.

[00132] Os anticorpos anti-ApoC3 ou as composições farmacêuticas divulgado(a)s nesse documento podem ser administrado(a)s isoladamente ou em combinação com um agente terapêutico adicional. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é outro agente redutor de lipídios. Qualquer um ou mais de agentes de redução de lipídeos pode(m) ser usado(s) em combinação com um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento. Os agentes de redução de lipídeos adequados incluem, sem limitação, inibidores da HMG-CoA redutase (*por exemplo*, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina ou sinvastatina), fibratos, niacina, sequestrantes de ácidos biliares (*por exemplo*, colestiramina, colestipol e colesevelam), inibidores de absorção de colesterol na dieta (*por exemplo*, ezetimiba), inibidores da proteína microssomal de transferência de triglicerídeos (MTP) (*por exemplo*, lomitapida),

fitoesteróis, inibidores da lipase pancreática (*por exemplo*, orlistat), inibidores da proteína de transferência de éster colesterílico, inibidores da esqualeno sintase (*por exemplo*, TAK-475, ácido zaragózico e RPR 107393), ApoA-1 Milano, succinobucol (AGI-1067), inibidores da apoproteína-B (*por exemplo*, Mipomersen), e inibidores da pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) (*por exemplo*, alirocumabe, evolocumabe e bococizumabe). Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios adicional é uma combinação de ezetimiba e um inibidor de HMG-CoA redutase. Em certas modalidades, o agente redutor de lipídios é uma combinação de ezetimiba, um inibidor de HMG-CoA redutase e um inibidor de PCSK9.

[00133] Os anticorpos anti-ApoC3 ou as composições farmacêuticas divulgados nesse documento podem ser dispensados a um indivíduo por uma variedade de vias. Estes incluem, mas não estão limitados a, vias parentéricas, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneais, intravenosas e subcutâneas. Em certas modalidades, o anticorpo ou a composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento é dispensado(a) por via subcutânea ou intravenosa.

[00134] A quantidade de um anticorpo anti-ApoC3 ou uma composição farmacêutica divulgado(a) nesse documento que será eficaz no tratamento ou na prevenção de uma condição dependerá da natureza da doença, e pode ser determinada empiricamente por técnicas clínicas padrão. A dose exata a ser empregada em uma composição também dependerá da via de administração, e da gravidade da infecção ou doença causada por ela, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do médico e as circunstâncias de cada indivíduo. Por exemplo,

doses eficazes também podem variar dependendo dos meios de administração, local de destino, estado fisiológico do paciente (incluindo idade, peso corporal e saúde), se o paciente é humano ou animal, outros medicamentos administrados ou se o tratamento é profilático ou terapêutico. Os anticorpos anti-ApoC3 ou composições farmacêuticas divulgadas nesse documento podem ser administrados em qualquer frequência (*por exemplo*, a cada semana, a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada mês ou a cada dois meses). Usualmente, o paciente é humano, mas também podem ser tratados mamíferos não humanos, incluindo mamíferos transgênicos. As dosagens e os regimes de tratamento são titulados de maneira ideal para otimizar a segurança e a eficácia.

[00135] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição também podem ser usados para fazer ensaio os níveis de proteína ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humana) em uma amostra biológica usando métodos imuno-histológicos clássicos conhecidos dos habilitados na técnica, incluindo imunoensaios, tais como, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), imunoprecipitação ou Western blotting. Rótulos de ensaios de anticorpos adequados são conhecidos na técnica e incluem rótulos enzimáticos, tais como, glicose oxidase; radioisótopos, tais como, iodo (^{125}I, ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^{3}H), índio (^{121}In) e tecnécio (^{99}Tc); rótulos luminescentes, tal como luminol; e rótulos fluorescentes, tais como, fluoresceína e rodamina, e biotina. Tais rótulos podem ser usados para rotular um anticorpo divulgado nesse documento. Alternativamente, um segundo anticorpo que reconhece um anticorpo anti-ApoC3

divulgado nesse documento pode ser rotulado e usado em combinação com um anticorpo anti-ApoC3 para detectar os níveis de proteína ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano).

[00136] O ensaio do nível de expressão da proteína ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humana) pretende incluir a medição qualitativa ou quantitativa ou a estimativa do nível da proteína ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humana) em uma primeira amostra biológica diretamente (*por exemplo*, determinar ou estimar o nível absoluto de proteína) ou relativamente (*por exemplo*, em comparação com o nível de proteína associado à doença em uma segunda amostra biológica). O nível de expressão do polipeptídeo ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) na primeira amostra biológica pode ser medido ou estimado e comparado com um nível de proteína ApoC3 padrão (*por exemplo*, ApoC3 humano), o padrão sendo retirado de uma segunda amostra biológica obtida de um indivíduo que não tem o distúrbio ou sendo determinado pela média dos níveis de uma população de indivíduos que não apresentam o distúrbio. Como será apreciado na técnica, uma vez conhecido o nível de polipeptídeo ApoC3 "padrão" (*por exemplo*, ApoC3 humano), ele pode ser usado repetidamente como um padrão para comparação.

[00137] Como usado nesse documento, o termo "amostra biológica" refere-se a qualquer amostra biológica obtida de um indivíduo, linha celular, tecido ou outra fonte de células que expressam potencialmente ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). Os métodos para obter biópsias de tecidos e fluidos corporais de animais (*por exemplo*, humanos) são bem conhecidos na técnica. As amostras biológicas incluem células sanguíneas mononucleares periféricas.

[00138] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa

descrição podem ser usados para aplicações prognósticas, diagnósticas, de monitoramento e de triagem, incluindo aplicações *in vitro* e *in vivo* bem conhecidas e padrão para as pessoas habilitadas na técnica e com base na presente descrição. Ensaios prognósticas, diagnósticas, de monitoramento e de triagem e kits para análise e avaliação *in vitro* do estado do sistema imune ou resposta imune podem ser utilizados para prever, diagnosticar e monitorar para avaliar amostras de pacientes, incluindo aquelas conhecidas por terem ou suspeitarem de ter atividade de ApoC3 elevada. Em uma modalidade, um anticorpo anti-ApoC3 pode ser usado na imuno-histoquímica de amostras de biópsia. Em outra modalidade, um anticorpo anti-ApoC3 pode ser usado para detectar níveis de ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), cujos níveis podem então ser ligados a certos sintomas da doença. Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição podem portar um rótulo detectável ou funcional. Quando são usados rótulos de fluorescência, a microscopia atualmente disponível e a análise de classificador de células ativadas por fluorescência (FACS) ou combinação de ambos os procedimentos dos métodos conhecidos na técnica podem ser utilizados para identificar e quantificar os membros de ligação específicos. Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição podem portar um rótulo de fluorescência. Rótulos de fluorescência de exemplo incluem, por exemplo, sondas reativas e conjugadas, *por exemplo*, Aminocumarina, Fluoresceína e vermelho Texas, corantes Alexa Fluor, corantes Cy e corantes DyLight. Um anticorpo anti-ApoC3 pode portar um rótulo radioativo, tais como os isótopos ^{3}H, ^{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 e ^{186}Re. Quando são usados rótulos radioativos, os procedimentos de contagem atualmente disponíveis, conhecidos na técnica, podem ser utilizados para identificar e quantificar a ligação específica do anticorpo anti-ApoC3 a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). No caso em que o rótulo é uma enzima, a detecção pode ser realizada por qualquer uma das técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluorospectrofotométricas, amperométricas ou gasométricas atualmente utilizadas, como conhecidas na técnica. Isto pode ser conseguido entrando em contato com uma amostra ou uma amostra de controle com um anticorpo anti-ApoC3 sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo e ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). Quaisquer complexos formados entre o anticorpo e ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) são detectados e comparados na amostra e no controle. Os anticorpos divulgados nessa descrição também podem ser usados para purificar ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) via purificação por imunoafinidade. Também incluído nesse documento está um sistema de ensaio que pode ser preparado na forma de um kit de teste para a análise quantitativa da extensão da presença de, por exemplo, ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). O sistema ou kit de teste pode compreender um componente rotulado, por exemplo, um anticorpo ApoC3 rotulado, e um ou mais reagentes imunoquímicos adicionais.

4. Composições Farmacêuticas

[00139] São providas aqui composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento com o grau de pureza desejado em um carreador, excipiente ou estabilizador fisiologicamente aceitável

(Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Carreadores, excipientes ou estabilizadores aceitáveis não são tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas e incluem tampões, tais como, fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como, cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos, tais como, metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclo-hexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como, albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como, polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, tais como, EDTA; açúcares, tais como, sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal, tal como sódio; complexos de metais (*por exemplo*, complexos de proteína Zn); ou tensoativos não iônicos, tais como, TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

[00140] Em uma modalidade específica, as composições farmacêuticas compreendem um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento e, opcionalmente, um ou mais de agentes profiláticos ou terapêuticos adicionais, em um carreador farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade específica, as composições farmacêuticas compreendem uma quantidade

eficaz de um anticorpo divulgado nesse documento e, opcionalmente, um ou mais de agentes profiláticos ou terapêuticos adicionais, em um carreador farmaceuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o anticorpo é o único ingrediente ativo incluído na composição farmacêutica. As composições farmacêuticas divulgadas nesse documento podem ser úteis na inibição da atividade da ApoC3 e no tratamento de uma condição, tal como câncer ou uma doença infecciosa.

[00141] Os carreadores farmaceuticamente aceitáveis usados em preparações parentéricas incluem veículos aquosos, veículos não aquosos, agentes antimicrobianos, agentes isotônicos, tampões, antioxidantes, anestésicos locais, agentes de suspensão e dispersão, agentes emulsificantes, agentes sequestrantes ou quelantes e outras substâncias farmaceuticamente aceitáveis. Exemplos de veículos aquosos incluem Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringers, Injeção Isotônica de Dextrose, Injeção de Água Estéril, Dextrose e Injeção de Ringers Lactados. Os veículos parenterais não aquosos incluem óleos fixos de origem vegetal, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de gergelim e óleo de amendoim. Agentes antimicrobianos em concentrações bacteriostáticas ou fungistáticas podem ser adicionados a preparações parentéricas acondicionadas em recipientes de doses múltiplas que incluem fenóis ou cresóis, mercuriais, álcool benzílico, clorobutanol, ésteres metílicos e propílicos de ácido p-hidroxibenzóico, timerosal, cloreto de benzalcônio e cloreto de benzetônio. Agentes isotônicos incluem cloreto de sódio e dextrose. Os tampões incluem fosfato e citrato. Antioxidantes incluem bissulfato de sódio. Anestésicos locais incluem cloridrato

de procaína. Os agentes de suspensão e dispersão incluem carboximetilcelulose sódica, hidroxipropilmetilcelulose e polivinilpirrolidona. Agentes emulsificantes incluem Polissorbato 80 (TWEEN® 80). Um agente sequestrante ou quelante de íons metálicos inclui EDTA. Os carreadores farmacêuticos também incluem álcool etílico, polietileno glicol e propileno glicol para veículos miscíveis em água; e hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido lático para ajuste do pH.

[00142] Uma composição farmacêutica pode ser formulada para qualquer via de administração a um indivíduo. Exemplos específicos de vias de administração incluem intranasal, oral, pulmonar, transdérmica, intradérmica e parentérica. A administração parentérica, caracterizada por injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa, também é contemplada nesse documento. Os injetáveis podem ser preparados em formas convencionais, tais como, soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Os injetáveis, soluções e emulsões também contêm um ou mais excipientes. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol ou etanol. Além disso, se desejado, as composições farmacêuticas a serem administradas também podem conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como, agentes umectantes ou emulsificantes, agentes tamponantes de pH, estabilizadores, intensificadores de solubilidade e outros tis agentes, tais como, por exemplo, acetato de sódio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina e ciclodextrinas.

[00143] As preparações para administração parenteral de

um anticorpo incluem soluções estéreis prontas para injeção, produtos solúveis secos estéreis, tais como, pós liofilizados, prontas para serem combinadas com um solvente imediatamente antes do uso, incluindo comprimidos hipodérmicos, suspensões estéreis prontas para injeção, produtos insolúveis secos estéreis prontos para serem combinados com um veículo imediatamente antes do uso e emulsões estéreis. As soluções podem ser aquosas ou não aquosas.

[00144] Se administrados por via intravenosa, carreadores adequados incluem solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS), e soluções contendo agentes espessantes e solubilizantes, tais como, glicose, polietileno glicol e polipropileno glicol e misturas dos mesmos.

[00145] As misturas tópicas compreendendo um anticorpo são preparadas como descrito para a administração local e sistêmica. A mistura resultante pode ser uma solução, suspensão, emulsões ou similares e pode ser formulada, tais como, cremes, géis, pomadas, emulsões, soluções, elixires, loções, suspensões, tinturas, pastas, espumas, aerossóis, irrigações, sprays, supositórios, bandagens, emplastros dérmicos ou quaisquer outras formulações adequadas para administração tópica.

[00146] Um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento pode ser formulado como um aerossol para aplicação tópica, tal como por inalação (ver, *por exemplo*, Patentes US Nos 4.044.126, 4.414.209 e 4.364.923, que descrevem aerossóis para a dispensação de um esteroide útil para o tratamento de doenças inflamatórias, particularmente asma). Estas

formulações para administração ao trato respiratório podem estar na forma de um aerossol ou uma solução para um nebulizador, ou como um pó microfino para insuflações, isoladamente ou em combinação com um carreador inerte, tal como a lactose. Nesse caso, as partículas da formulação terão, em uma modalidade, diâmetros menores que 50 mícrons, em uma modalidade menor que 10 mícrons.

[00147] Um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento pode ser formulado para aplicação local ou tópica, tal como aplicação tópica na pele e membranas mucosas, tal como no olho, na forma de géis, cremes e loções e para aplicação para os olhos ou para aplicação intracisternal ou intraespinal. A administração tópica é contemplada para dispensação transdérmica, e também para administração aos olhos ou mucosa, ou para terapias de inalação. As soluções nasais do anticorpo isoladamente ou em combinação com outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis também podem ser administradas.

[00148] Os emplastros transdérmicos, incluindo dispositivos iontoforéticos e eletroforéticos, são bem conhecidos dos habilitados na técnica e podem ser usados para administrar um anticorpo. Por exemplo, esses emplastros são divulgados nas patentes US 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 e 5.860.957.

[00149] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica compreendendo um divulgado nesse documento é um pó liofilizado, que pode ser reconstituído para administração como soluções, emulsões e outras misturas. Também pode ser reconstituído e formulado como sólidos ou

géis. O pó liofilizado é preparado dissolvendo um anticorpo divulgado nesse documento, ou um seu derivado farmaceuticamente aceitável, em um solvente adequado. Em algumas modalidades, o pó liofilizado é estéril. O solvente pode conter um excipiente que melhora a estabilidade ou outro componente farmacológico do pó ou da solução reconstituído(a), preparado a partir do pó. Os excipientes que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, dextrose, sorbitol, frutose, xarope de milho, xilitol, glicerina, glicose, sacarose ou outro agente adequado. O solvente também pode conter um tampão, tais como, citrato, fosfato de sódio ou potássio ou outro tampão conhecido dos habilitados na técnica, em uma modalidade, em pH neutro. A filtração estéril subsequente da solução seguida de liofilização sob condições padrão conhecidas dos habilitados na técnica provê a formulação desejada. Em uma modalidade, a solução resultante será distribuída em frascos para liofilização. Cada frasco conterá uma dose única ou doses múltiplas do composto. O pó liofilizado pode ser armazenado sob condições apropriadas, tais como cerca de 4°C até a temperatura ambiente. A reconstituição deste pó liofilizado com água para injeção provê uma formulação para uso na administração parenteral. Para reconstituição, o pó liofilizado é adicionado à água estéril ou a outro carreador adequado. A quantidade precisa depende do composto selecionado. Essa quantidade pode ser determinada empiricamente.

[00150] Os anticorpos anti-ApoC3 divulgados nessa descrição e outras composições aqui provido(a)s também podem ser formulado(a)s para serem direcionado(a)s a um tecido,

receptor ou outra área específica do corpo do indivíduo a ser tratado. Muitos desses métodos de direcionamento são bem conhecidos dos habilitados na técnica. Todos esses métodos de direcionamento são contemplados nesse documento para uso nas composições instantâneas. Para exemplos não limitativos de métodos de direcionamento, ver, por exemplo, as patentes US Nos 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, 5.985.305.552, 5.985.305 e 5.709.874.

[00151] As composições a serem usadas para administração *in vivo* podem ser estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através, *por exemplo*, de membranas de filtração estéreis.

5. Polinucleotídeos, Vetores e Métodos de Produção de Anticorpos Anti-ApoC3

[00152] Em outro aspecto, são providos nesse documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento (*por exemplo*, uma região variável da cadeia leve ou região variável da cadeia pesada) e vetores, *por exemplo*, vetores compreendendo esses polinucleotídeos para expressão recombinante nas células hospedeiras (*por exemplo*, *E. coli* e células de mamíferos).

[00153] Como usado nesse documento, uma molécula de polinucleotídeo ou ácido nucleico "isolada" é aquela que é separada de outras moléculas de ácido nucleico que estão presentes na fonte natural (*por exemplo*, em um camundongo ou em um humano) da molécula de ácido nucleico. Além disso, uma molécula de ácido nucleico "isolada", tal como uma molécula de cDNA, pode estar substancialmente livre de outro material

celular, ou meio de cultura quando produzido por técnicas recombinantes, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizados quimicamente. Por exemplo, a linguagem "substancialmente livre" inclui preparações de moléculas de polinucleotídeo ou ácido nucleico com menos que cerca de 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% (em particular menos que cerca de 10%) de outro material, *por exemplo*, material celular, meio de cultura, outras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos ou outros produtos químicos. Em uma modalidade específica, uma molécula(s) de ácido nucleico que codifica(m) um anticorpo divulgado nesse documento é isolada ou purificada.

[00154] Em aspectos particulares, são providos nesse documento polinucleotídeos que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam anticorpos, que se ligam especificamente ao polipeptídeo ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e compreendem uma sequência de aminoácidos como divulgada nesse documento, bem como anticorpos que competem com esses anticorpos pela ligação ao polipeptídeo ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) (*por exemplo*, de maneira dependente da dose), ou que se liga ao mesmo epítopo que desses anticorpos.

[00155] Em certos aspectos, são providos nesse documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de nucleotídeos que codifica a cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo divulgado nesse documento. Os polinucleotídeos podem compreender sequências de nucleotídeos que codificam os VH, VL ou CDRs dos anticorpos divulgados nessa descrição (ver, *por exemplo*, as Tabelas 1-4 nesse documento).

[00156] Também são providos nesse documento

polinucleotídeos que codificam um anticorpo anti-ApoC3 que são otimizados, *por exemplo*, por otimização de códon/RNA, substituição por sequências de sinal heterólogas e eliminação de elementos de instabilidade de mRNA. Métodos para gerar ácidos nucleicos otimizados que codificam um anticorpo anti-ApoC3 (*por exemplo*, cadeia leve, cadeia pesada, domínio VH ou domínio VL) para expressão recombinante através da introdução de alterações de códons ou eliminação de regiões inibitórias no mRNA podem ser realizados adaptando os métodos de otimização descritos em, *por exemplo*, Patentes US Nos 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; e 6.794.498, de acordo. Por exemplo, potenciais sítios de splice e elementos de instabilidade (*por exemplo*, elementos ricos em A/T ou A/U) no RNA podem ser mutados sem alterar os aminoácidos codificados pelas sequências de ácidos nucleicos para aumentar a estabilidade do RNA para a expressão recombinante. As alterações utilizam a degenerescência do código genético, *por exemplo*, usando um códon alternativo para um aminoácido idêntico. Em algumas modalidades, pode ser desejável alterar um ou mais de códons para codificar uma mutação conservadora, *por exemplo*, um aminoácido semelhante com estrutura e propriedades químicas semelhantes ou funcionar como o aminoácido original. Tais métodos podem aumentar a expressão de um anti-ApoC3 em pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou 100 vezes ou mais em relação à expressão de um anticorpo anti-ApoC3 codificado por polinucleotídeos que não foram otimizados.

[00157] Em certas modalidades, uma sequência de

polinucleotídeos otimizada que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento (*por exemplo*, domínio VL ou domínio VH) pode hibridizar para um polinucleotídeo antissentido (*por exemplo*, complementar) de uma sequência de polinucleotídeos não otimizada que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento (*por exemplo*, domínio VL ou domínio VH). Em modalidades específicas, uma sequência de nucleotídeos otimizada que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento ou um fragmento hibridiza sob condições de alta estringência com o polinucleotídeo antissentido de uma sequência de polinucleotídeos não otimizada que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento. Em uma modalidade específica, uma sequência de nucleotídeos otimizada que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado hibridiza nesse documento condições de hibridização sob alta estringência, intermediárias ou de baixa estringência para um polinucleotídeo antissentido de uma sequência de nucleotídeos não otimizada que codifica um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento. As informações relativas às condições de hibridização foram descritas, ver, por exemplo, a Publicação de Pedido de Patente US N° 2005/0048549 (*por exemplo*, parágrafos 72-73), que é aqui incorporada por referência.

[00158] Os polinucleotídeos podem ser obtidos, e a sequência de nucleotídeos dos polinucleotídeos determinados, por qualquer método conhecido na técnica. Sequências de nucleotídeos que codificam anticorpos divulgados nessa descrição, *por exemplo*, anticorpos descritos na Tabela 1, e versões modificadas desses anticorpos podem ser determinadas usando métodos bem conhecidos na técnica, *isto é*, códons de

nucleotídeos conhecidos por codificar aminoácidos específicos são montados de maneira a gerar um ácido nucleico que codifica o anticorpo. Esse polinucleotídeo que codifica o anticorpo pode ser montado a partir de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (*por exemplo*, como descrito em Kutmeier G *et al.*, (1994), BioTechniques 17: 242-6), que, brevemente, envolve a síntese de oligonucleotídeos sobrepostos contendo porções da sequência que codifica o anticorpo, anelando e ligando desses oligonucleotídeos e, em seguida, amplificação dos oligonucleotídeos ligados por PCR.

[00159] Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo divulgado nesse documento pode ser gerado de ácido nucleico a partir de uma fonte adequada (*por exemplo*, um hibridoma) usando métodos bem conhecidos na técnica (*por exemplo*, PCR e outros métodos de clonagem molecular). Por exemplo, a amplificação por PCR usando iniciadores sintéticos hibridizáveis para as extremidades 3’ e 5’ de uma sequência conhecida pode ser realizada usando DNA genômico obtido de células de hibridoma que produzem o anticorpo de interesse. Tais métodos de amplificação por PCR podem ser usados para obter ácidos nucleicos compreendendo a sequência que codifica a cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo. Tais métodos de amplificação por PCR podem ser usados para obter ácidos nucleicos compreendendo a sequência que codifica a região variável da cadeia leve ou a região variável da cadeia pesada de um anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados podem ser clonados em vetores para expressão em células hospedeiras e para clonagem adicional, por exemplo, para gerar anticorpos quiméricos e humanizados.

[00160] Se um clone que contém um ácido nucleico que

codifica um anticorpo específico não está disponível, mas a sequência da molécula de anticorpo é conhecida, um ácido nucleico que codifica a imunoglobulina pode ser quimicamente sintetizado ou obtido de uma fonte adequada (*por exemplo*, uma biblioteca de cDNA de anticorpo ou uma biblioteca de cDNA gerada a partir de, ou ácido nucleico, de preferência, poli A+ RNA, isolado de, qualquer tecido ou células que expressem o anticorpo, tais como, células de hibridoma selecionadas para expressar um anticorpo divulgado nesse documento) por amplificação por PCR usando iniciadores sintéticos hibridizáveis para as extremidades 3’ e 5’ da sequência ou por clonagem usando uma sonda de oligonucleotídeos específica para a sequência de genes específica para identificar, *por exemplo*, um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem então ser clonados em vetores de clonagem replicáveis usando qualquer método bem conhecido na técnica.

[00161] O DNA que codifica anticorpos anti-ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) divulgados nessa descrição pode ser facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (*por exemplo*, usando sondas oligonucleotídicas que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve dos anticorpos anti-ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano)). As células de hibridoma podem servir como fonte desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras, tais como, células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) (*por exemplo*, células CHO do CHO GS System™ (Lonza)),

ou células de mieloma que não produzem, de outra forma, proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos anti-ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) nas células hospedeiras recombinantes.

[00162] Para gerar anticorpos inteiros, iniciadores de PCR incluindo sequências de nucleotídeos VH ou VL, um sítio de restrição, e uma sequência de flanqueamento para proteger o sítio de restrição podem ser usados para amplificar as sequências VH ou VL em clones scFv. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas pelos habilitados na técnica, os domínios VH amplificados por PCR podem ser clonados em vetores que expressam uma região constante da cadeia pesada, *por exemplo*, a região constante gama 4 humana, e os domínios VL amplificados por PCR podem ser clonados em vetores que expressam uma região constante da cadeia leve, *por exemplo*, regiões constantes capa ou lambda humanas. Em certas modalidades, os vetores para expressar os domínios VH ou VL compreendem um promotor EF-1α, um sinal de secreção, um sítio de clonagem para a região variável, domínios constantes, e um marcador de seleção, tal como neomicina. Os domínios VH e VL também podem ser clonados em um vetor que expressa as regiões constantes necessárias. Os vetores de conversão da cadeia pesada e vetores de conversão da cadeia leve são então cotransfectados em linhas celulares para gerar linhas celulares estáveis ou transitórias que expressam anticorpos de comprimento total, *por exemplo*, IgG, usando técnicas conhecidas dos versados na técnica.

[00163] O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência codificadora por domínios constantes das cadeia pesada e leve humana no lugar das

sequências de murinos, ou unindo-se covalentemente à sequência codificadora da imunoglobulina, na totalidade ou em parte da sequência codificadora a um polipeptídeo não imunoglobulínico.

[00164] Também são providos polinucleotídeos que hibridizam sob condições de hibridização de alta estringência, intermediária ou baixa estringência a polinucleotídeos que codificam um anticorpo divulgado nesse documento. Em modalidades específicas, os polinucleotídeos divulgados nessa descrição hibridizam sob condições de hibridização de alta estringência, intermediária ou baixa estringência a polinucleotídeos que codificam um domínio VH ou domínio VL providos nesse documento.

[00165] As condições de hibridização foram descritas na técnica e são conhecidas dos habilitados na técnica. Por exemplo, a hibridização sob condições estringentes pode envolver hibridização a DNA ligado a filtro em 6x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguido por uma ou mais lavagem(ns) em 0,2xSSC/SDS a 0,1% a cerca de 50-65°C; a hibridização sob condições altamente estringentes pode envolver hibridização a ácido nucleico ligado a filtro em 6xSSC a cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagem(ns) em 0,1xSSC/SDS a 0,2% a cerca de 68°C. A hibridização sob outras condições de hibridização estringentes é conhecida daqueles habilitados na técnica e foi descrita, ver, por exemplo, Ausubel FM *et al.*, eds., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Filhos, Inc., Nova Iorque, nas páginas 6.3.1-6.3.6 e 2.10.3.

[00166] Em certos aspectos, são providas nesse documento

células (*por exemplo*, células hospedeiras) que expressam anticorpos (*por exemplo*, recombinantemente) divulgados nessa descrição que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e polinucleotídeos e vetores de expressão relacionados. São providos nesse documento vetores (*por exemplo*, vetores de expressão) compreendendo polinucleotídeos que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam anticorpos anti-ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) ou um fragmento para expressão recombinante em células hospedeiras, de preferência em células de mamíferos. Também são providas nesse documento células hospedeiras que compreendem esses vetores para a expressão recombinante de anticorpos anti-ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) divulgados nessa descrição (*por exemplo*, anticorpo humano ou humanizado). Em um aspecto particular, são providos nesse documento métodos para a produção de um anticorpo divulgado nesse documento, compreendendo a expressão desse anticorpo a partir de uma célula hospedeira.

[00167] A expressão recombinante de um anticorpo divulgado nesse documento (*por exemplo*, um anticorpo de comprimento completo, cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou um anticorpo de cadeia única divulgado nesse documento) que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) envolve a construção de um vector de expressão contendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo. Uma vez obtido um polinucleotídeo que codifica uma molécula de anticorpo, cadeia pesada ou leve de um anticorpo (*por exemplo*, regiões variáveis da cadeia pesada ou leve) divulgados nesse documento, o vetor para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por tecnologia de

DNA recombinante, usando técnicas bem conhecidas na técnica. Assim, métodos para preparar uma proteína expressando um polinucleotídeo contendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo (*por exemplo*, cadeia leve ou cadeia pesada) que codifica a sequência de nucleotídeos são divulgados nessa descrição. Os métodos que são bem conhecidos dos habilitados na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo sequências codificantes de anticorpo ou fragmento de anticorpo (*por exemplo*, cadeia leve ou cadeia pesada) e sinais de controle transcricionais e traducionais apropriados. Esses métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. Também são providos vetores replicáveis compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica uma molécula de anticorpo divulgada nesse documento, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, uma região variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou uma CDR da cadeia pesada ou leve, operacionalmente ligada a um promotor. Tais vetores podem, por exemplo, incluir a sequência de nucleotídeos que codifica a região constante da molécula de anticorpo (ver, *por exemplo*, as Publicações Internacionais N^{os} WO 86/05807 e WO 89/01036; e Patente US No. 5.122.464) e regiões variáveis do anticorpo pode ser clonado nesse vetor para expressão de toda a cadeia pesada, toda a cadeia leve, ou de ambas as cadeias pesada e leve.

[00168] Um vetor de expressão pode ser transferido para uma célula (*por exemplo*, célula hospedeira) por técnicas convencionais e as células resultantes podem ser cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo divulgado nesse documento. Assim, são providas nesse

documento células hospedeiras contendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo divulgado nesse documento, ou uma cadeia pesada ou leve, ou fragmento do mesmo, ou um anticorpo de cadeia única divulgado nesse documento, operacionalmente ligado a um promotor para expressão de tais sequências na célula hospedeira. Em certas modalidades, para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, os vetores que codificam as cadeias pesada e leve, individualmente, podem ser coexpressados na célula hospedeira para expressão de toda a molécula de imunoglobulina, como detalhado abaixo. Em certas modalidades, uma célula hospedeira contém um vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada e a cadeia leve de um anticorpo divulgado nesse documento. Em modalidades específicas, uma célula hospedeira contém dois vetores diferentes, um primeiro vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada ou região variável da cadeia pesada de um anticorpo divulgado nesse documento, ou um fragmento do mesmo, e um segundo vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve ou uma região variável da cadeia leve de um anticorpo divulgado nesse documento, ou um fragmento do mesmo. Em outras modalidades, uma primeira célula hospedeira compreende um primeiro vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada ou região variável da cadeia pesada de um anticorpo divulgado nesse documento, ou um fragmento do mesmo, e uma segunda célula hospedeira compreende um segundo vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve ou uma região variável da cadeia leve de um anticorpo divulgado nesse documento. Em modalidades específicas, uma região variável

da cadeia pesada/cadeia pesada expressada por uma primeira célula associada a uma cadeia leve/região variável da cadeia leve de uma segunda célula para formar um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento. Em certas modalidades, é provida nesse documento uma população de células hospedeiras compreendendo essa primeira célula hospedeira e essa segunda célula hospedeira.

[00169] Em uma modalidade específica, é provida nesse documento uma população de vetores compreendendo um primeiro vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma cadeia leve/região variável da cadeia leve de um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento, e um segundo vetor compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma cadeia pesada/região variável da cadeia pesada de um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento.

[00170] Uma variedade de sistemas de vetor de expressão de hospedeiro pode ser utilizada para expressar moléculas de anticorpo divulgadas nesse documento (ver, *por exemplo*, Patente U.S. Nº 5.807.715). Tais sistemas de expressão de hospedeiro representam veículos pelos quais as sequências de codificação de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de codificação de nucleotídeos apropriadas, expressar uma molécula de anticorpo divulgada nesse documento *in situ*. Estes incluem, mas não estão limitados a, microrganismos, tais como, bactérias (*por exemplo*, *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA de plasmídeo ou DNA cosmídeo contendo sequências de codificação de anticorpos;

levedura (*por exemplo*, *Saccharomyces Pichia*) transformada com vetores de expressão de levedura recombinantes contendo sequências codificadoras de anticorpo; sistemas de células de inseto infectados com vetores de expressão de vírus recombinantes (*por exemplo*, baculovírus) contendo sequências codificadoras de anticorpo; sistemas de células vegetais (*por exemplo*, algas verdes, tal como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectados com vetores de expressão de vírus recombinantes (*por exemplo*, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão do plasmídeo recombinante (*por exemplo*, plasmídeo Ti) contendo sequências codificadoras de anticorpo; ou sistemas de células de mamíferos (*por exemplo*, células COS (*por exemplo*, COS1 ou COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7O3O, HsS78Bst, HeLa, e NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 e BMT10) que abrigam construções de expressão recombinantes contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (*por exemplo*, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (*por exemplo*, o promotor tardio de adenovírus; promotor do vírus vaccinia 7,5K). Em uma modalidade específica, as células para expressar anticorpos divulgados nessa descrição são células CHO, por exemplo células CHO do CHO GS System™ (Lonza). Em uma modalidade particular, as células para expressar anticorpos divulgados nessa descrição são células humanas, *por exemplo*, linhas celulares humanas. Em uma modalidade específica, um vetor de expressão em mamífero é pOptiVEC™ ou pcDNA3.3. Em uma modalidade particular, células bacterianas, tais como, *Escherichia coli*, ou células eucarióticas (*por exemplo*,

células de mamíferos), especialmente para a expressão de toda a molécula de anticorpo recombinante, são usadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, células de mamíferos, tais como, células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vetor, tal como o principal elemento promotor de genes intermediários iniciais do citomegalovírus humano, é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-5; e Cockett MI *et al.*, (1990) Biotechnology 8(7): 662-7). Em certas modalidades, os anticorpos divulgados nessa descrição são produzidos por células CHO ou células NS0. Em uma modalidade específica, a expressão de sequências de nucleotídeos que codificam anticorpos divulgados nessa descrição que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) é regulada por um promotor constitutivo, promotor induzível ou promotor específico de tecido.

[00171] Em sistemas bacterianos, vários vetores de expressão podem ser selecionados com vantagem, dependendo do uso pretendido para a molécula de anticorpo sendo expressada. Por exemplo, quando se produz uma grande quantidade desse anticorpo, para a geração de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, vetores que direcionam a expressão de altos níveis de produtos de proteínas de fusão que são facilmente prontamente podem ser desejáveis. Tais vetores incluem, mas não estão limitados a, o vetor de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), no qual a sequência codificadora de anticorpo pode ser ligada individualmente ao vetor em quadro com a região codificadora Z lac de modo que uma proteína de fusão

seja produzida; vectores pIN (Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509); e similares. Por exemplo, os vetores pGEX também podem ser usados para expressar polipeptídeos estranhos como proteínas de fusão com glutationa 5-transferase (GST). Em geral, essas proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células lisadas por adsorção e ligação a esferas de glutationa agarose de matriz seguidas de eluição na presença de glutationa livre. Os vetores pGEX são projetados para incluir sítios de clivagem de trombina ou fator Xa protease, de modo que o produto gênico alvo clonado possa ser liberado da porção GST.

[00172] Em um sistema de insetos, o vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por exemplo, pode ser usado como um vetor para expressar genes estranhos. O vírus cresce nas células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificadora de anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (*por exemplo*, o gene da poliedrina) do vírus e colocada sob controle de um promotor de AcNPV (*por exemplo*, o promotor de poliedrina).

[00173] Nas células hospedeiras de mamíferos, vários sistemas de expressão baseados em vírus podem ser utilizados. Nos casos em que um adenovírus é usado como um vetor de expressão, a sequência codificadora de anticorpo de interesse pode ser ligada a um complexo de controle de transcrição/tradução de adenovírus, *por exemplo*, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode então ser inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção em uma região

não essencial do genoma viral (*por exemplo*, região El ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (*por exemplo*, ver Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9). Sinais de iniciação específicos também podem ser necessários para a tradução eficiente de sequências codificadoras de anticorpo inseridas. Estes sinais incluem o códon de iniciação ATG e sequências adjacentes. Além disso, o códon de iniciação deve estar em fase com o quadro de leitura da sequência codificadora desejada para garantir a tradução de toda a inserção. Esses sinais de controle de tradução exógenos e códons de iniciação podem ter várias origens, naturais e sintéticas. A eficácia da expressão pode ser intensificada pela inclusão de elementos intensificadores de transcrição apropriados, terminadores de transcrição, *etc*. (ver, *por exemplo*, Bitter G *et al.*, (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544).

[00174] Além disso, pode ser escolhida uma cepa de célula hospedeira que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto gênico da maneira específica desejada. Tais modificações (*por exemplo*, glicosilação) e processamento (*por exemplo*, clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função da proteína. Diferentes células hospedeiras têm mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-tradução e a modificação de proteínas e produtos gênicos. Linhas celulares ou sistemas hospedeiros apropriada(o)s podem ser escolhida(o)s para garantir a modificação e o processamento corretos da proteína estranha expressada. Para este fim, podem ser usadas células hospedeiras eucarióticas que

possuem o mecanismo celular para o processamento adequado da transcrição, glicosilação e fosforilação primárias do produto gênico. Tais células hospedeiras de mamíferos incluem, mas não estão limitadas a, células CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O e T47D, NS0 (uma linha celular de mieloma de murino que não produz endogenamente quaisquer cadeias de imunoglobulina), células CRL7O3O, COS (*por exemplo*, COS1 ou COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 e HsS78Bst. Em certas modalidades, os anticorpos anti-ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) divulgados nessa descrição são produzidos em células de mamíferos, tais como células CHO.

[00175] Em uma modalidade específica, os anticorpos divulgados nessa descrição têm conteúdo de fucose reduzido ou nenhum conteúdo de fucose. Tais anticorpos podem ser produzidos usando técnicas conhecidas dos habilitados na técnica. Por exemplo, os anticorpos podem ser expressados em células deficientes ou sem capacidade de ser expressados em fucosilato. Em um exemplo específico, podem ser usadas linhas celulares com um nocaute de ambos os alelos de α1,6-fucosiltransferase para produzir anticorpos com um conteúdo reduzido de fucose. O sistema Potelligent® (Lonza) é um exemplo desse sistema que pode ser usado para produzir anticorpos com conteúdo de fucose reduzido.

[00176] Para produção a longo prazo e de alto rendimento de proteínas recombinantes, células de expressão estável podem ser geradas. Por exemplo, as linhas celulares que expressam estavelmente um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento podem ser manipuladas. Em modalidades

específicas, uma célula provida nesse documento expressa estavelmente uma cadeia leve/região variável da cadeia leve e uma cadeia pesada/região variável da cadeia pesada que se associa para formar um anticorpo divulgado nesse documento.

[00177] Em certos aspectos, em vez de usar vetores de expressão que contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados (*por exemplo*, promotor, intensificador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável. Após a introdução do DNA/polinucleotídeo estranho, as células manipuladas podem crescer por 1-2 dias em um meio enriquecido, e depois são trocadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo em seus cromossomos e cresçam para formar focos que, por sua vez, podem ser clonados e expandidos em linhas celulares. Este método pode ser vantajosamente usado para manipular linhas celulares que expressam um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento. Tais linhas celulares manipuladas podem ser particularmente úteis na triagem e na avaliação de composições que interagem direta ou indiretamente com a molécula de anticorpo.

[00178] Vários sistemas de seleção podem ser usados, incluindo, entre outros, os genes de timidina quinase (Wigler M *et al.*, (1977) Cell 11(1): 223-32), hipoxantinaguanina fosforibosiltransferase (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) e adenina fosforibosiltransferase (Lowy I *et al.*, (1980) Cell 22(3): 817-23) dos vírus do herpes simplex nas células tk, hgprt ou aprt,

respectivamente. Além disso, a resistência a antimetabólito pode ser usada como base de seleção para os seguintes genes: *dhfr*, que confere resistência ao metotrexato (Wigler M *et al.*, (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K *et al.*, (1981) PNAS 78: 1527-31); *gpt*, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, que confere resistência a aminoglicosídeo G-418 (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; e Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); e *hygro*, que confere resistência à higromicina (Santerre RF *et al.*, (1984) Gene 30(1-3): 147-56). Os métodos comumente conhecidos na técnica da tecnologia de DNA recombinante podem ser aplicados rotineiramente para selecionar o clone recombinante desejado e esses métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel FM *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Filhos, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); e nos capítulos 12 e 13, Dracopoli NC *et al.*, (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Filhos, NY (1994); Colbère-Garapin F *et al.*, (1981) J Mol Biol 150: 1-14, que são incorporados por referência nesse documento na sua totalidade.

[00179] Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados pela amplificação do vetor (para uma revisão, ver Bebbington CR & Hentschel CCG, O uso de vetores baseados na amplificação de genes para a expressão de genes clonados em células de mamíferos na clonagem de

DNA, Vol. 3 (Academic Press, Nova Iorque, 1987)). Quando um marcador no sistema vetorial que expressa anticorpo é amplificável, o aumento no nível de inibidor presente na cultura da célula hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada é associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse GF et al., (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66).

[00180] A célula hospedeira pode ser cotransfectada com dois ou mais de vetores de expressão descritos nesse documento, o primeiro vetor que codifica um polipeptídeo derivado da cadeia pesada e o segundo vetor que codifica um polipeptídeo derivado da cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos que permitem a expressão igual de polipeptídeos de cadeias pesada e leve. As células hospedeiras podem ser cotransfectadas com diferentes quantidades dos dois ou mais vetores de expressão. Por exemplo, as células hospedeiras podem ser transfectadas com qualquer uma das seguintes razões de um primeiro vetor de expressão e um segundo vetor de expressão: 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 ou 1:50.

[00181] Alternativamente, pode ser usado um único vetor que codifica e é capaz de expressar polipeptídeos de cadeias pesada e leve. Em tais situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada livre de tóxicos (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; e Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199). As sequências de codificação para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genômico. O vetor de expressão pode

ser monocistrônico ou multicistrônico. Uma construção de ácido nucleico multicistrônico pode codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, ou na faixa de 2-5, 5-10 ou 10-20 sequências de genes/nucleotídeos. Por exemplo, uma construção de ácido nucleico bicistrônico pode compreender na seguinte ordem um promotor, um primeiro gene (*por exemplo*, cadeia pesada de um anticorpo divulgado nesse documento), e um segundo gene e (*por exemplo*, cadeia leve de um anticorpo divulgado nesse documento). Nesse vetor de expressão, a transcrição de ambos os genes pode ser conduzida pelo promotor, enquanto a tradução do mRNA do primeiro gene pode ser por um mecanismo de varredura dependente da capa e a tradução do mRNA do segundo gene pode ser por um mecanismo independente da capa, *por exemplo*, por um IRES.

[00182] Uma vez que uma molécula de anticorpo divulgada nesse documento tenha sido produzida por expressão recombinante, ela pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (*por exemplo*, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade com o antígeno específico após a proteína A, e cromatografia em coluna de exclusão de tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Além disso, os anticorpos divulgados nessa descrição podem ser fundidos com sequências de polipeptídeos heterólogas divulgadas nesse documento ou conhecidas na técnica para facilitar a purificação.

[00183] Em modalidades específicas, um anticorpo divulgado nesse documento é isolado ou purificado. Geralmente, um anticorpo isolado é aquele que está

substancialmente livre de outros anticorpos com especificidades antigênicas diferentes do anticorpo isolado. Por exemplo, em uma modalidade específica, uma preparação de um anticorpo divulgado nesse documento é substancialmente livre de material celular ou precursores químicos. A linguagem "substancialmente livre de material celular" inclui preparações de um anticorpo no qual o anticorpo é separado dos componentes celulares das células das quais é isolado ou produzido de forma recombinante. Assim, um anticorpo que é substancialmente livre de material celular inclui preparações de anticorpos tendo menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% (em peso seco) de proteína heteróloga (também aqui referida como uma "proteína contaminante") ou variantes de um anticorpo, por exemplo, diferentes formas pós-traducionais modificadas de um anticorpo ou outras versões diferentes de um anticorpo (*por exemplo*, fragmentos de anticorpo). Quando o anticorpo é produzido de forma recombinante, geralmente também é substancialmente livre de meio de cultura, *isto é*, o meio de cultura representa menos que cerca de 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% do volume da preparação de proteínas. Quando o anticorpo é produzido por síntese química, geralmente é substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos, *isto é*, é separado de precursores químicos ou outros produtos químicos que estão envolvidos na síntese da proteína. Por conseguinte, essas preparações do anticorpo têm menos que cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (em peso seco) de precursores químicos ou compostos diferentes do anticorpo de interesse. Em uma modalidade específica, os anticorpos divulgados nessa descrição são isolados ou purificados.

[00184] Os anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, por exemplo, por síntese química ou por técnicas de expressão recombinante. Os métodos divulgados nessa descrição empregam, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais em biologia molecular, microbiologia, análise genética, DNA recombinante, química orgânica, bioquímica, PCR, síntese e modificação de oligonucleotídeos, modificação e hibridização de oligonucleotídeos, hibridização de ácidos nucleicos e campos relacionados dentro da habilidade da técnica. Essas técnicas são descritas, por exemplo, nas referências citadas nesse documento e são totalmente explicadas na literatura. Ver, *por exemplo*, Maniatis T *et al.*, (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Filhos (1987 e atualizações anuais); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Filhos (1987 e atualizações anuais) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[00185] Em uma modalidade específica, um anticorpo divulgado nesse documento é um anticorpo (*por exemplo*,

anticorpo recombinante) preparado, expressados, criado ou isolado por qualquer meio que envolva criação, *por exemplo*, via síntese, engenharia genética de sequências de DNA. Em certas modalidades, esse anticorpo compreende sequências (*por exemplo*, sequências de DNA ou sequências de aminoácidos) que não existem naturalmente no repertório de linha germinal de anticorpos de um animal ou mamífero (*por exemplo*, humano) *in vivo*.

[00186] Em um aspecto, é provido nesse documento um método para preparar um anticorpo que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) compreendendo a cultura de uma célula ou célula hospedeira divulgada nesse documento. Em um certo aspecto, é provido nesse documento um método para preparar um anticorpo que se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) compreendendo a expressão (*por exemplo*, expressão recombinante) do anticorpo usando uma célula ou célula hospedeira divulgada nesse documento (*por exemplo*, uma célula ou um célula hospedeira compreendendo polinucleotídeos que codificam um anticorpo divulgado nesse documento). Em uma modalidade particular, a célula é uma célula isolada. Em uma modalidade particular, os polinucleotídeos exógenos foram introduzidos na célula. Em uma modalidade particular, o método compreende adicionalmente a etapa de purificação do anticorpo obtido a partir da célula ou célula hospedeira.

[00187] Os métodos para a produção de anticorpos policlonais são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Capítulo 11 em: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley e Filhos, Nova Iorque).

[00188] Os anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo o uso de tecnologias de hibridoma, recombinante e de exibição de fagos, ou uma combinação das mesmas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando técnicas de hibridoma, incluindo os conhecidos na técnica, e ensinados, por exemplo, em Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, em: Monoclonal Antibodies e T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). O termo "anticorpo monoclonal", como usado nessa descrição, não se limita a anticorpos produzidos através da tecnologia de hibridoma. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos recombinantemente a partir de células hospedeiras que expressam exogenamente um anticorpo divulgado nesse documento, por exemplo, cadeia leve ou cadeia pesada desse anticorpo.

[00189] Em modalidades específicas, um "anticorpo monoclonal", como usado nesse documento, é um anticorpo produzido por uma única célula (*por exemplo*, hibridoma ou célula hospedeira produzindo um anticorpo recombinante), em que o anticorpo se liga especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), como determinado, *por exemplo*, por ELISA ou outro ensaio de ligação a antígeno ou de ligação competitiva conhecido na técnica ou nos exemplos providos nesse documento. Em modalidades particulares, um anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Em certas modalidades, um anticorpo monoclonal é um anticorpo monovalente ou anticorpo multivalente (*por exemplo*, bivalente). Em modalidades particulares, um

anticorpo monoclonal é um anticorpo monoespecífico ou multiespecífico (*por exemplo*, anticorpo biespecífico). Os anticorpos monoclonais divulgados nessa descrição podem, por exemplo, ser preparados pelo método de hibridoma como descrito em Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495 ou podem, por exemplo, ser isolados de bibliotecas de fagos usando as técnicas como divulgadas nesse documento, por exemplo. Outros métodos para a preparação de linhas celulares clonais e de anticorpos monoclonais expressados assim são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Capítulo 11 em: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª Ed., Ausubel FM *et al., supra*).

[00190] Os métodos para produzir e rastrear anticorpos específicos usando a tecnologia de hibridoma são rotineiros e bem conhecidos na técnica. Por exemplo, no método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, tais como, ovelha, cabra, coelho, rato, hamster ou macaco Macaca, é imunizado para provocar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente à proteína (*por exemplo*, ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humana)) usada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Adicionalmente, pode ser usadas uma técnica RIMMS (múltiplos sítios de imunização repetitiva) para imunizar um animal (Kilpatrick KE *et al.*, (1997) Hybridoma 16:381-9, incorporado por referência na sua totalidade).

[00191] Em algumas modalidades, camundongos (ou outros animais, tais como, ratos, macacos, burros, porcos, ovelhas, hamster ou cães) podem ser imunizados com um antígeno (*por exemplo*, ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano)) e uma vez a resposta imune é detectada, *por exemplo*, anticorpos específicos para o antígeno são detectados no soro do camundongo, o baço do camundongo é colhido e os esplenócitos isolados. Os esplenócitos são então fundidos por técnicas bem conhecidas a quaisquer células de mieloma adequadas, por exemplo, células da linha celular SP20 disponíveis na American Type Culture Collection (ATCC®) (Manassas, VA), para formar hibridomas. Os hibridomas são selecionados e clonados por diluição limitada. Em certas modalidades, os linfonodos dos camundongos imunizados são colhidos e fundidos com células de mieloma NS0.

[00192] As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e cultivadas em um meio de cultura adequado que contém, de preferência, uma ou mais de substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente inclui hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que impedem o crescimento de células deficientes de HGPRT.

[00193] Modalidades específicas empregam células de mieloma que se fundem com eficácia, suportam a produção estável de alto nível de anticorpo pelas células produtoras de anticorpos selecionadas e são sensíveis a um meio, tal como meio HAT. Entre essas linhas celulares de mieloma estão

as linhas de mieloma de murino, tais como, linha celular NS0 ou aquelas derivadas de tumores de camundongos MOPC-21 e MPC-11 disponíveis no Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8.653 disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA. Também foram descritas linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma de camundongo-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur *et al*., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

[00194] O meio de cultura em que as células de hibridoma estão crescendo é submetido à ensaio quanto à produção de anticorpos monoclonais direcionados contra ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). A especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

[00195] Após a identificação de células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade ou atividade desejada, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitantes e desenvolvidos por métodos padrão (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, *supra*). Meios de cultura adequados para esta finalidade incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI 1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um animal.

[00196] Os anticorpos monoclonais secretados pelos

subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina, tais como, por exemplo, Proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

[00197] Os anticorpos divulgados nessa descrição incluem fragmentos de anticorpo que reconhecem ApoC3 específico (*por exemplo*, ApoC3 humano) e podem ser gerados por qualquer técnica conhecida dos habilitados na técnica. Por exemplo, os fragmentos Fab e $F(ab')_2$ divulgados nesse documento podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, usando enzimas, tais como, papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos $F(ab')_2$). Um fragmento Fab corresponde a um dos dois braços idênticos de uma molécula de anticorpo e contém a cadeia leve completa pareada com os domínios VH e CH1 da cadeia pesada. Um fragmento $F(ab')_2$ contém os dois braços de ligação a antígeno de uma molécula de anticorpo ligada por ligações dissulfeto na região de dobradiça.

[00198] Além disso, os anticorpos divulgados nessa descrição também podem ser gerados usando vários métodos de exibição de fagos conhecidos na técnica. Nos métodos de exibição de fagos, os domínios funcionais de anticorpos são exibidos na superfície das partículas de fagos que transportam as sequências de polinucleotídeos que codificam os mesmos. Em particular, as sequências de DNA que codificam os domínios VH e VL são amplificadas a partir de bibliotecas de cDNA de animais (*por exemplo*, bibliotecas de cDNA de humanos ou murinos de tecidos afetados). O DNA que codifica os domínios VH e VL é recombinado juntamente com um ligante

scFv por PCR e clonado em um vetor de fagemídeo. O vetor é eletroporado em *E. coli* e o *E. coli* é infectado com fago auxiliar. Os fagos usados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos, incluindo fd e M13, e os domínios VH e VL são usualmente fundidos de forma recombinante ao gene III ou ao gene VIII do fago. O fago que expressa um domínio de ligação a antígeno que se liga a um antígeno específico pode ser selecionado ou identificado com o antígeno, *por exemplo*, usando o antígeno rotulado ou antígeno ligado a ou capturado para uma superfície sólida ou esfera. Exemplos de métodos de exibição de fagos que podem ser usados para preparar os anticorpos divulgados nessa descrição incluem aqueles divulgados em Brinkman U *et al.*, (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; Pedido PCT Nº PCT/GB91/001134; Pedido PCT Nºs WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, e WO 97/13844; e Patente U.S. Nºs 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 e 5.969.108.

[00199] Como descrito nas referências acima, após a seleção do fago, as regiões codificadoras de anticorpos do fago podem ser isoladas e usadas para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos ou qualquer outro fragmento de ligação a antígeno desejado, e expressados em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células de mamíferos, células de insetos, células vegetais, leveduras

e bactérias, *por exemplo*, como descrito abaixo. Técnicas para produzir de forma recombinante fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab, Fab' e $F(ab')_2$, também podem ser empregados usando métodos conhecidos na técnica, como os divulgados na publicação PCT N° WO 92/22324; Mullinax RL *et al.*, (1992) BioTechniques 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34; e Better M *et al.*, (1988) Science 240: 1041-1043.

[00200] Em certas modalidades, para gerar anticorpos inteiros, iniciadores de PCR incluindo sequências de nucleotídeos VH ou VL, um sítio de restrição, e uma sequência de flanqueamento para proteger o sítio de restrição podem ser usados para amplificar as sequências VH ou VL de um molde, *por exemplo*, clones scFv. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas pelos habilitados na técnica, os domínios VH amplificados por PCR podem ser clonados em vetores que expressam uma região constante de VH, e os domínios VL amplificados por PCR podem ser clonados em vetores que expressam uma região constante de VL, *por exemplo*, regiões constantes capa ou lambda humanas. Os domínios VH e VL também podem ser clonados em um vetor que expressa as regiões constantes necessárias. Os vetores de conversão de cadeia pesada e vetores de conversão de cadeia leve são então cotransfectados em linhas celulares para gerar linhas celulares estáveis ou transitórias que expressam anticorpos de comprimento total, *por exemplo*, IgG, utilizando técnicas conhecidas daqueles habilitados na técnica.

[00201] Um anticorpo quimérico é uma molécula na qual diferentes porções do anticorpo são derivadas de diferentes

moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode conter uma região variável de um anticorpo monoclonal de camundongo ou rato fundido a uma região constante de um anticorpo humano. Os métodos para a produção de anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Ver, *por exemplo*, Morrison SL (1985) Science 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) BioTechniques 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) J Immunol Methods 125: 191-202; e Patentes U.S. Nos 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 e 6.331.415.

[00202] Um anticorpo humanizado é capaz de se ligar a um antígeno predeterminado e que compreende uma região estrutural tendo substancialmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e CDRs tendo substancialmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina não humana (*por exemplo*, uma imunoglobulina de murino). Em modalidades particulares, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, de dobradiça, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Um anticorpo humanizado pode ser selecionado de qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, e qualquer isotipo, incluindo IgG_1, IgG_2, IgG_3 e IgG_4. Os anticorpos humanizados podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, enxerto de CDR (Patente Europeia N° EP 239400; Publicação Internacional WO N°91/09967; e Patentes US Nos 5.225.539, 5.530.101, e 5.585.089), modificação superficial ou recomposição superficial (Patentes Europeias Nos EP 592106 e EP 519596; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28 (4/5): 489-498; Studnicka GM

et al., (1994) Prot Engineering 7 (6): 805-814 e Roguska MA *et al.*, (1994) PNAS 91: 969-973), embaralhamento de cadeias (Patente US No. 5.565.332) e técnicas divulgadas em, por exemplo, Pat. US N° 6.407.213, Pat. US N° 5.666.886, Publicação Internacional WO N° 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) J Immunol 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) Protein Eng. 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) Methods 20(3): 267-79; Baca M *et al.*, (1997) J Biol Chem 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) Protein Eng 9(10): 895 904; Couto JR *et al.*, (1995) Cancer Res. 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) Cancer Res 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) Gene 150(2): 409-10 E Pedersen JT *et al.*, (1994) J Mol Biol 235(3): 959-73. Ver também a Publicação de Pedido US N° 2005/0042664 A1 (24 de fev. de 2005), que é incorporada por referência nesse documento na sua totalidade.

[00203] Os métodos para produzir multiespecíficos (*por exemplo*, anticorpos biespecíficos) foram descritos, ver, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 7.951.917; 7.183.076; 8.227.577; 5.837.242; 5.989.830; 5.869.620; 6.132.992 e 8.586.713.

[00204] Os anticorpos de domínio único, por exemplo, anticorpos que não possuem as cadeias leves, podem ser produzidos por métodos bem conhecidos na técnica. Ver Riechmann L & Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25-38; Nuttall SD *et al.*, (2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74(4): 277-302; Patente U.S. N° 6.005.079; e Publicações Internacionais N^{os} WO 94/04678, WO 94/25591 e WO 01/44301.

[00205] Além disso, os anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) podem,

por sua vez, ser utilizados para gerar anticorpos anti-idiotipo que "imitam" um antígeno usando técnicas bem conhecidas daqueles habilitados na técnica. (Ver, *por exemplo*, Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; e Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438).

[00206] Em modalidades particulares, um anticorpo divulgado nesse documento, que se liga ao mesmo epítopo de ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) que um anticorpo anti-ApoC3 divulgado nesse documento, é um anticorpo humano. Em modalidades particulares, um anticorpo divulgado nesse documento, que bloqueia competitivamente (*por exemplo*, de maneira dependente da dose) qualquer um dos anticorpos divulgados nessa descrição, da ligação a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano), é um anticorpo humano. Os anticorpos humanos podem ser produzidos usando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, camundongos transgênicos que são incapazes de expressar imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulina humana, podem ser usados. Em particular, os complexos genéticos da imunoglobulina das cadeia pesada e leve humana podem ser introduzidos aleatoriamente ou por recombinação homóloga nas células tronco embrionárias de camundongo. Alternativamente, a região variável humana, a região constante e a região de diversidade podem ser introduzidas nas células tronco embrionárias de camundongo, além dos genes das cadeias pesada e leve humanas. Os genes da imunoglobulina das cadeia pesada e leve de camundongo podem se tornar separadamente ou simultaneamente não funcionais com a introdução de locais de imunoglobulina humana por recombinação homóloga. Em particular, a deleção homozigótica da região J_H impede a

produção endógena de anticorpos. As células tronco embrionárias modificadas são expandidas e microinjetadas em blastocistos para produzir camundongos quiméricos. Os camundongos quiméricos são então criados para produzir descendentes homozigotos que expressam anticorpos humanos. Os camundongos transgênicos são imunizados da maneira normal com um antígeno selecionado, *por exemplo*, todo o antígeno ou uma porção de um antígeno (*por exemplo*, ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano)). Os anticorpos monoclonais direcionados contra o antígeno podem ser obtidos a partir de camundongos transgênicos imunizados usando a tecnologia convencional de hibridoma. Os transgenes da imunoglobulina humana abrigados pelos camundongos transgênicos se rearranjam durante a diferenciação das células B, e subsequentemente sofrem troca de classe e mutação somática. Assim, usando esta técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma visão geral desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos, ver Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93. Para uma discussão detalhada desta tecnologia para a produção de anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para a produção de tais anticorpos, ver, *por exemplo*, as Publicações Internacionais Nºs WO 98/24893, WO 96/34096 e WO 96/33735; e Patentes U.S. Nos. 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 e 5.939.598. Exemplos de camundongos capazes de produzir anticorpos humanos incluem o Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; Patentes US 6.075.181 e 6.150.184), o HuAb-Mouse™ (Mederex, Inc./Gen Pharm; Patentes US 5.555.806 e 5.569, 825), o Trans Chromo Mouse™ (Kirin) e o KM Mouse™

(Medarex/Kirin).

[00207] Os anticorpos humanos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) podem ser preparados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo métodos de exibição de fagos descritos acima, usando bibliotecas de anticorpos derivadas de sequências de imunoglobulinas humanas. *Ver* também as Patentes U.S. Nos 4.444.887, 4.716.111 e 5.885.793; e Publicações Internacionais Nos WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 e WO 91/10741.

[00208] Em algumas modalidades, os anticorpos humanos podem ser produzidos usando hibridomas de humano-camundongo. Por exemplo, linfócitos do sangue periférico humano transformados com o vírus Epstein-Barr (EBV) podem ser fundidos com células de mieloma de camundongo para produzir hibridomas de humano-camundongo secretando anticorpos monoclonais humanos, e esses hibridomas de humano-camundongo podem ser triados para determinar aqueles que secretam anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente a um antígeno alvo (*por exemplo*, ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano)). Tais métodos são conhecidos e são descritos na técnica, ver, *por exemplo*, Shinmoto H *et al.*, (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) Human Antibodies 14: 27-31.

6. Kits

[00209] Também são providos kits que compreendem um ou mais de anticorpos divulgados nessa descrição, ou composição farmacêutica ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade específica, é provido nesse documento um pacote ou kit

farmacêutico compreendendo um ou mais de recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas divulgadas nesse documento, como um ou mais de anticorpos providos nesse documento. Em algumas modalidades, os kits contêm uma composição farmacêutica divulgada nesse documento e qualquer agente profilático ou terapêutico, tais como os divulgados nessa descrição. Opcionalmente associado a esse(s) recipiente(s), pode haver um aviso na forma prescrita por uma agência governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, aviso que reflete a aprovação da agência de fabricação, do uso ou da venda para administração humana.

[00210] Também são providos kits que podem ser usados nos métodos acima. Em uma modalidade, um kit compreende um anticorpo divulgado nesse documento, de preferência um anticorpo purificado, em um ou mais de recipientes. Em uma modalidade específica, os kits divulgados nessa descrição contêm um antígeno de ApoC3 substancialmente isolado (*por exemplo*, ApoC3 humano) como controle. Em outra modalidade específica, os kits divulgados nessa descrição compreendem adicionalmente um anticorpo de controle que não reage com um antígeno ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). Em outra modalidade específica, os kits divulgados nessa descrição contêm um ou mais elementos para detectar a ligação de um anticorpo a antígeno ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) (*por exemplo*, o anticorpo pode ser conjugado a um substrato detectável, tal como um composto fluorescente, um substrato enzimático, um composto radioativo ou um composto luminescente, ou um segundo anticorpo que reconhece o primeiro anticorpo pode ser conjugado com um substrato

detectável). Em modalidades específicas, um kit provido nesse documento pode incluir um antígeno de ApoC3 produzido recombinantemente ou sintetizado quimicamente (*por exemplo*, ApoC3 humano). O antígeno ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) fornecido no kit também pode ser ligado a um suporte sólido. Em uma modalidade mais específica, o meio de detecção do kit descrito acima inclui um suporte sólido ao qual está ligado um antígeno ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano). Esse kit também pode incluir um anticorpo anti-humano rotulado com repórter não ligado ou anticorpo anti-camundongo/rato. Nesta modalidade, a ligação do anticorpo a antígeno ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) pode ser detectada pela ligação do referido anticorpo rotulado com repórter.

EXEMPLOS

[00211] O clone de anticorpo identificado anteriormente, 5E5, liga-se a ApoC3 com alta afinidade a pH 7,4 e afinidade levemente reduzida a pH 5,5 (ver pedido provisório US 62/360.084). A presente divulgação provê novos derivados do clone 5E5 que exibem alta afinidade de ligação a ApoC3 a pH 7,4, mas afinidade muito reduzida a ApoC3 a pH 5,5 em relação a 5E5. Os exemplos a seguir descrevem a caracterização dos novos derivados 5E5. As sequências de aminoácidos de 5E5 são apresentadas no pedido provisório U.S. 62/360.084, e as sequências de aminoácidos dos novos derivados de 5E5 são apresentadas nas Tabelas 1-7, nesse documento.

[00212] Os exemplos nesta Seção são providos para elucidar adicionalmente as vantagens e os recursos do presente pedido, mas não pretendem limitar o escopo do pedido. Os exemplos são apenas para fins ilustrativos.

Exemplo 1: Caracterização *in vitro* de anticorpos scFv-Fc

anti-ApoC3.

[00213] Este exemplo descreve experimentos baseados em ressonância de plasmon de superfície (SPR) para determinar a cinética de ligação a antígeno, em pH 7,4 e pH 5,5, de anticorpos scFv-Fc anti-ApoC3.

[00214] Um painel de novos derivados do clone de anticorpo 5E5 foi gerado por substituição de um ou mais aminoácidos CDR no VH e/ou VL de 5E5 por histidina. A cinética de ligação a antígeno, em pH 7,4 e pH 5,5, de cada derivado 5E5 foi avaliada usando o método baseado em SPR apresentado abaixo, e clones exibindo alta afinidade de ligação a ApoC3 a pH 7,4, mas afinidade mais reduzida a ApoC3 a pH 5,5 em relação a 5E5 foram selecionados para caracterização adicional. A cinética de ligação de derivados 5E5 de exemplo 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT e 5E5VHWT_VL8 são apresentados na Tabela 14.

[00215] Os anticorpos de teste foram produzidos a partir de células HEK293 transfectadas em 50 ml de culturas em pequena escala e purificados por cromatografia em proteína A usando o sistema de cromatografia pura ÄKTA. A qualidade e os rendimentos dos fragmentos purificados dos anticorpos foram determinados por espectrofotometria e por SDS-PAGE.

[00216] Foi empregado um método baseado em SPR, no qual o ApoC3 humano biotinilado foi capturado em um chip revestido com estreptavidina (SA), e a cinética de ligação dos anticorpos de teste ao chip revestido foi medida em pH 7,4 e pH 5,5. Resumidamente, foram injetados 20 µL de ApoC3 humano biotinilado a uma concentração de 10 µg/ml para atingir uma densidade superficial de aproximadamente 500 RU. 60 µl de cada anticorpo de teste foram diluídos em tampão

HBS-EP (GE, cat. nº BR-1008-26; HEPES 0,010 M, NaCl 0,150M, EDTA 3mM, tensoativo P20 a 0,05% (v/v), pH 7,4), e foi injetado a uma concentração de 1-100 nM. Os anticorpos de teste foram passados pelas células de fluxo a uma vazão de 30 µl/min, seguida por uma lavagem de dissociação de pH 7,4 ou pH 5,5 por 5 minutos. Os sensogramas resultantes foram analisados usando o software BIAevaluation 4.1, aplicando o modelo de ligação Langmuir 1:1 para derivar a cinética de ligação. Os dados foram ajustados a zero e os sensogramas de células de referência foram subtraídos.

Tabela 14. Cinética de ligação de anticorpos scFv-Fc anti-ApoC3 a pH 7,4 e pH 5,5

Anticorpo	**Taxa de Associação**		**Taxa de Dissociação**		**Afinidade**		
	ka (1/Ms) pH 7,4	**ka (1/Ms) pH 5,5**	**kd (1/s) pH 7,4**	**kd (1/s) pH 5,5**	K_D **(nM) pH 7,4**	K_D **(nM) pH 5,5**	K_D **pH 5,5/** K_D **pH 7,4**
5E5WT	8,23E+05	3,93E+05	1,75E-05	2,53E-05	0,02	0,06	3,0
5E5VH5_VLWT	1,78E+05	1,47E+05	1,05E-04	1,60E-03	0,59	10,90	18,5
5E5VH12_VLWT	3,08E+05	1,29E+05	1,57E-04	2,06E-03	0,51	16,00	31,4
5E5VHWT_VL8	3,81E+05	2,69E+05	2,21E-04	1,16E-03	0,58	4,29	7,4

[00217] Todos os anticorpos scFv-Fc testados exibiram maior afinidade por ApoC3 a pH 7,4 do que a pH 5,5, com o anticorpo 5E5VH12_VLWT mostrando a ligação dependente de pH mais pronunciada (ver a Tabela 14). A magnitude da ligação dependente do pH correlacionou-se positivamente com a taxa de dissociação sob condições ácidas.

Exemplo 2: Caracterização *in vitro* de anticorpos IgG_1 humanos anti-ApoC3.

[00218] Com base nos resultados do Exemplo 1, os anticorpos scFv-Fc de teste foram gerados como anticorpos

IgG_1 humanos. Foi empregado um ensaio baseado em SPR, no qual a proteína ApoC3 humana foi imobilizada em um chip CM5, e a cinética de ligação dos anticorpos de teste ao chip revestido foi medida em pH 7,4 e pH 5,5. Resumidamente, uma solução de 50 µg/ml de ApoC3 humano nativo em tampão acetato 10 mM a pH 4,5 foi preparada e injetada até a densidade superficial atingir aproximadamente 500 RU. 60 µl de cada anticorpo de teste foram diluídos em tampão HBS-EP (GE, cat. BR-1008-26; HEPES 0,010 M, NaCl 0,150M, EDTA 3mM, tensoativo P20 a 0,05% (v/v), pH 7,4), e foi injetado em uma concentração como descrito na Tabela 9. Os anticorpos de teste foram passados pelas células de fluxo a uma vazão de 30 µl/min, seguida por uma lavagem de dissociação de pH 7,4 ou pH 5,5 por 5 minutos. Os sensogramas resultantes foram analisados usando o software BIAevaluation 4.1, aplicando o modelo de ligação Langmuir 1:1 para derivar a cinética de ligação. Os dados foram ajustados a zero e os sensogramas de células de referência foram subtraídos.

Tabela 15. Cinética de ligação de anticorpos IgG_1 humanos anti ApoC3 a pH 7,4 e pH 5,5

Anticorpo	**pH**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**Rmax (RU)**	**Concentração**	K_D **(M)**
5E5WT	7,4	3,50E+05	1,79E-05	475	50-0,8nM	5,12E-11
	5,5	3,40E+05	1,70E-05	519	50-0,8nM	4,99E-11
5E5VH5_ VLWT	7,4	1,78E+05	3,77E-05	347	50-0,8nM	2,11E-10
	5,5	1,55E+05	2,03E-04	313	50-0,8nM	1,31E-09
5E5VH12_ VLWT	7,4	3,93E+05	1,38E-05	420	50-0,8nM	3,51E-11
	5,5	3,66E+05	3,74E-04	413	50-0,8nM	1,02E-09
5E5VHWT_ VL8	7,4	7,82E+05	2,84E-05	479	25-0,8nM	3,63E-11
	5,5	7,31E+05	4,06E-05	463	25-0,8nM	5,56E-11
5E5VH5_VL8	7,4	1,77E+05	1,73E-04	309	50-0,8nM	9,75E-10
	5,5	2,11E+05	2,42E-03	183	50-0,8nM	1,14E-08
5E5VH12_ VL8	7,4	2,67E+05	1,63E-04	291	50-0,8nM	6,09E-10
	5,5	1,88E+05	1,65E-03	523	50-0,8nM	8,79E-09

Anticorpo	**pH**	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**Rmax (RU)**	**Concentração**	K_D **(M)**
5E5VH5VH12_VLWT	7,4	6,16E+04	3,05E-04	220	50-0,8nM	4,96E-09
	5,5	1,56E+05	3,16E-03	381	50-0,8nM	2,02E-08
5E5VH5VH12_VL8	7,4	1,25E+05	2,80E-03	702	50-0,8nM	2,24E-08
	5,5	Nenhuma ligação detectada				

[00219] Todos os anticorpos testados se ligaram a ApoC3 humano a pH 7,4 e tiveram afinidade reduzida a ApoC3 a pH 5,5 (ver a Tabela 15). 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT, 5E5VH5_VL8 e 5E5VH12_VL8 mostram dependência de pH particularmente pronunciada.

Exemplo 3: Efeito de anticorpos anti-ApoC3 na captação de VLDL por hepatócitos.

[00220] Neste exemplo, foi determinada a capacidade dos anticorpos anti-ApoC3 para atenuar a captação de VLDL pelos hepatócitos.

[00221] Brevemente, as células HepG2 (ATCC HB-8065) foram cultivadas em uma superfície revestida com poli-d-lisina em Meio Mínimo Essencial completo (MEM) suplementado com FCS a 10% por 24 horas, e em MEM completo suplementado com 0,0125% de albumina sérica bovina (meio MEM-BSA) por mais 24 horas. As células foram pré-incubadas com proteína ApoC3 humana 3 µM (Athens Research and Technology) e anticorpo de teste 3 µM no formato de IgG_1 por 15 minutos em meio MEM-BSA fresco, e 30 µg/mL de VLDL rotulado com DiI esgotado de ApoC3 (Kalen Biomedical, LLC #770130-9) foram adicionados ao meio. Após uma incubação de 4 horas, as células foram incubadas adicionalmente com MEM completo fresco suplementado com 1% de intralipídeo por 20 minutos. A quantidade de VLDL rotulado com DiI absorvida pelas células foi determinada por lise das células com isopropanol em

temperatura ambiente por 15 minutos, medindo a fluorescência do rótulo DiI no lisado (ex = 520 nm; em = 580), calculando a quantidade de VLDL rotulado com DiI usando uma curva padrão, e normalizando os dados com base na quantidade de proteína total no lisado. Os dados foram representados graficamente usando o GraphPad Prism 6 e são relatados como média +/- SEM. A ANOVA unidirecional com múltiplas comparações foi calculada usando o GraphPad Prism 6.

[00222] Como mostrado nas Figuras 1A, 1B e 1C, os anticorpos 5E5WT, 5E5VHWT_VL8, 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT e 5E5VH5_VL8 aumentaram a captação de VLDL pelas células HepG2. Em particular, os anticorpos 5E5VHWT_VL8, 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT e 5E5VH5_VL8 restauraram completamente a captação de VLDL na presença de ApoC3.

Exemplo 4: Farmacocinética e farmacodinâmica de anticorpos anti-ApoC3.

[00223] Este exemplo descreve a caracterização *in vivo* do anticorpo 5E5VH5_VL8 usando um modelo de camundongo tendo depuração de triglicerídeos prejudicada devido à expressão transgênica de ApoC3 humano.

4.1 Geração de modelo de camundongo

[00224] Camundongos machos C57BL/6 do tipo selvagem, com idade entre 60 a 63 dias, mantidos em uma dieta padrão da ração, foram infectados com $3x10^{11}$ partículas virais de um vetor AAV8 que abrigam um gene ApoC3 humano operacionalmente ligado a um promotor de globulina de ligação à tiroxina (TBG) (RegenXBio) por administração intraperitoneal. Doze dias após a administração, amostras de sangue foram coletadas do seio retro-orbital, e os níveis de ApoC3 humano nas amostras de sangue foram medidos por ELISA usando um anticorpo anti-

ApoC3 primário (ApoC3 anti-humano policlonal de coelho Abcam #ab21032) e um anticorpo ApoC3 secundário (ApoC3 conjugado com biotina policlonal da cabra Abcam #ab21024). Nos camundongos infectados, o nível sérico médio de ApoC3 humano foi de 9,9 µM. O nível médio de triglicerídeos em circulação após um jejum de quatro horas foi de 163 mg/dL nesses camundongos, enquanto o nível médio de triglicerídeos em circulação nos camundongos controle foi de 109 mg/dL (p=0,0065).

[00225] Os camundongos foram então agrupados de modo que todos os grupos apresentavam níveis médios similares de ApoC3 no dia 12. Quatorze dias após a infecção por AAV, amostras de sangue foram coletadas do seio retro-orbital para estabelecer os níveis de referência (T=0) de ApoC3. 25 mg/kg de um anticorpo IgG_1 humano anti-ApoC3 de teste foram administrados a cada camundongo por injeção no espaço subcutâneo dorsal. Um anticorpo IgG_1 humano de lisossoma anti-ovo de galinha (HyHEL5) foi usado como controle de isotipo. Amostras de sangue foram coletadas do seio retro-orbital 0, 2, 4, 8 e 24 horas após a administração dos anticorpos em teste, e aproximadamente a cada 2 dias depois por 30 dias. Todos os estudos em animais foram realizados de acordo com as recomendações do Guia para o Cuidado e o Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais de Vascumab, LLC.

4.2 Farmacocinética de anticorpos anti-ApoC3

[00226] Os ratos que expressam ApoC3 humano foram gerados e tratados como descrito na Seção 4.1. Os níveis plasmáticos dos anticorpos IgG_1 humanos foram determinados

com um ensaio ELISA. Especificamente, uma placa de 96 poços (Griener # 655061) foi revestida durante a noite a 4°C com 50 µL de anticorpo IgG primário (IgG anti-humano policlonal de cabra Fc Fitzgerald 41-XG57) diluído em PBS. A placa foi lavada 4 vezes com 200 µL de TBS-T, e bloqueada com 200 µL de tampão de bloqueio consistindo em 3% de BSA (fração Roche BSA V protease livre# 03 117 332 001) mais leite translúcido (Pierce Clear Milk Blocker # 37587) em PBS durante 90 minutos a 30°C. O tampão de bloqueio foi removido, e 50 µL da amostra de teste diluída em tampão de bloqueio foram adicionados e deixados incubar por 2 horas em temperatura ambiente com rotação a 300 rpm. A placa foi lavada quatro vezes com 200 µL de TBS-T, e 50 µL de anticorpo secundário (IgG anti-humano de cabra Abcam Fc (biotina) policlonal #ab97223) diluídos em tampão de bloqueio foram adicionados e deixados incubar por 1 hora em temperatura ambiente com rotação a 300 rpm. A placa foi lavada uma vez com TBS-T, e 50 µL de SA-HRP (Abcam #64269) diluídos 100 vezes em PBS foram adicionados e deixados incubar por 30 min em TA com rotação a 300 rpm. A placa foi então lavada 4 vezes com 200 µL de TBS-T, e desenvolvida com 80 µL de TMB. A reação cromogênica foi terminada por 50 µL de HCl 0,5 N. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 450 nm. As quantidades de IgG humana nos poços de teste foram calculadas a partir de um ajuste de 4 parâmetros de uma curva padrão (Molecular Devices) construída usando o anticorpo de teste purificado. Este método detecta ApoC3 humano especificamente, e não reage de forma cruzada com ApoC3 de camundongo.

[00227] Como mostrado na Figura 2A, o anticorpo 5E5 foi rapidamente degradado em camundongos que expressam ApoC3

humano. Isto pode ser explicado pela rápida renovação de ApoC3 através da captação de partículas lipídicas contendo ApoC3. O anticorpo 5E5VH5_VL8, que tem uma afinidade reduzida para ApoC3 em pH mais baixo, pode se dissociar de ApoC3 em organelas ácidas e retornar à corrente sanguínea por meio de reciclagem endossômica. A meia-vida de 5E5VH5_VL8 é de cerca de uma semana, o que é semelhante à meia-vida do anticorpo de controle de isotipo HyHel5 (um anticorpo que não se liga a um antígeno específico em camundongos). O nível plasmático de 5E5VH5_VL8 retornou à linha de base cerca de um mês após a injeção. A meia-vida prolongada de 5E5VH5_VL8 torna este anticorpo um excelente candidato para aplicação clínica, devido à baixa frequência de administração necessária para manter um nível terapêutico do anticorpo no soro.

4.3 Farmacodinâmica dos anticorpos anti-ApoC3

[00228] Os camundongos que expressam ApoC3 humano foram gerados e tratados como descrito na Seção 4.1. Os níveis plasmáticos de ApoC3 e ApoB humanos foram determinados com um ensaio ELISA. Especificamente, uma placa de 96 poços (Griener # 655061) foi revestida durante a noite a 4°C com 50 µL de anticorpo primário ApoC3 (ApoC3 anti-humano policlonal de coelho Abcam #ab21032) ou 50 µL de anticorpo primário ApoB (ApoB anti-humano policlonal de cabra da Meridian Life Sciences #K45253G) diluídos em PBS. A placa foi lavada 4 vezes com 200 µL de TBS-T, e bloqueada com 200 µL de tampão de bloqueio (Pierce Clear Milk Blocker #37587 em PBS) durante 90 minutos a 30°C. O tampão de bloqueio foi removido, e 50 µL da amostra de teste diluída em tampão de bloqueio foram adicionados e deixados incubar por 2 horas em temperatura ambiente com rotação a 300 rpm. A placa foi

lavada quatro vezes com 200 µL de TBS-T, e 50 µL de anticorpo secundário ApoC3 (ApoC3 conjugado com biotina policlonal de cabra Abcam #ab21024) ou anticorpo ApoB secundário (ApoB48/100 conjugado com biotina policlonal de cabra da Meridian Life Sciences #34003G) diluído em tampão de bloqueio foram adicionados e deixados incubar por 1 hora em temperatura ambiente com rotação a 300 rpm. A placa foi lavada uma vez com TBS-T, e 50 µL de SA-HRP (Abcam # 64269) diluído 100 vezes em PBS foram adicionados e deixados incubar por 30 minutos em temperatura ambiente com rotação a 300 rpm. A placa foi então lavada 4 vezes com 200 µL de TBS-T, e desenvolvida com 80 µL de TMB (Thermo Ultra-TMB ELISA #34028) seguido por 50 µL de HCL 0,5 N. A absorbância foi lida a 450 nm. A quantidade de ApoC3 nos poços de teste foi calculada a partir de um ajuste de 4 parâmetros de uma curva padrão (Molecular Devices) construída usando ApoC3 purificado (Athens Research and Technology). A quantidade de ApoB nos poços de teste foi calculada a partir de um ajuste de 4 parâmetros de uma curva padrão (Molecular Devices) construída usando VLDL de camundongo isolado por centrifugação (o conteúdo de ApoB é considerado como 20% do conteúdo total de proteína). Os dados foram calculados e plotados como valores percentuais em relação aos níveis correspondentes em camundongos tratados com o anticorpo de controle HyHel5.

[00229] Como mostrado nas Figuras 2B e 2C, o anticorpo 5E5 reduziu inicialmente os níveis plasmáticos de ApoC3 e ApoB humano, mas os níveis voltaram ao normal após cerca de 2 dias. Por outro lado, 5E5VH5_VL8 reduziu os níveis plasmáticos de ApoC3 e ApoB humano por cerca de um mês. Essa

longa duração de eficácia foi consistente com a meia-vida longa de 5E5VH5_VL8 e confirmou que 5E5VH5_VL8 seria um excelente candidato clínico.

Exemplo 5: Humanização de anticorpos anti-ApoC3

[00230] As variantes humanizadas de 5E5VH5_VL8 foram geradas de acordo com os métodos de "linhagem germinal" descritos em WO2012123586A1. Resumidamente, segmentos de genes da linha germinal humana com a mesma estrutura de dobra canônica e a mais alta identidade de sequência de aminoácidos nas regiões VH e VL de 5E5VH5_VL8 foram identificados por comparação com sequências de genes conhecidas da linha germinal humana. As sequências germinais mais próximas da cadeia pesada e da cadeia leve humana foram IGHV3-23*01 humana e IGKV2-28 01 humana, respectivamente. Uma biblioteca Fab de exibição de fagos de variantes 5E5VH5_VL8 foi construída que incorporou mutações humanizantes nos resíduos de aminoácidos de 5E5VH5_VL8 que diferem das sequências de linha germinal IGHV3-23*01 e IGKV2-28*01 humanas, com resíduos de lhama e humanos em cada posição alvo sendo igualmente representados na biblioteca. Mutações para remover os motivos de confiabilidade de sequência DG, DS, NR ou M também foram incorporadas na biblioteca. As variantes 5E5VH5_VL8 humanizadas com as melhores características de ligação alvo (*por exemplo*, ligação de alta afinidade a ApoC3 a pH 7,4, mas afinidade muito reduzida a ApoC3 a pH 5,5) foram identificadas após várias rodadas de seleções de exibição de fagos acionadas por afinidade.

[00231] Vinte anticorpos anti-ApoC3 humanizados que mantiveram uma alta afinidade, ligação dependente do pH foram identificados a partir da seleção e rastreamento iniciais

descritos acima. As sequências codificadoras de VH e Vκ desses anticorpos foram clonadas em um vetor de expressão, e produzidas nas células ExpiCHO-S como moléculas de IgG_1 de comprimento total. Os anticorpos foram então purificados usando a coluna Hitrap MabSelect Sure (GE, cat. 11-0034-94) em um sistema ÄKTA Pure. Os anticorpos foram eluídos usando 1,0 ml de tampão citrato 0,1 M a pH 3,0, e as frações eluídas foram coletados em tubos contendo 0,1 ml de Tris-HCl pH 9,0 para neutralização. As frações contendo anticorpos foram reunidas e dessalinizadas em 1x solução salina tamponada com fosfato (PBS; NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 15 mM, pH 7,4) usando uma coluna de dessalinização HiTrap no sistema ÄKTA Pure. As concentrações de proteína foram determinadas medindo a absorbância a 280 nm e a correção com coeficiente de extinção da seguinte forma: (A280nm-A340nm)/ε (coeficiente de extinção em g/L). As amostras purificadas foram examinadas por SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras para confirmar o tamanho e a pureza corretos das amostras.

[00232] Dois ensaios diferentes de ressonância de plasmon de superfície (SPR) foram realizados para avaliar os parâmetros de associação e dissociação dependentes do pH dos anticorpos anti-ApoC3 humanizados. Os métodos e resultados dos dois ensaios são descritos abaixo.

5.1 Análise de SPR da ligação do anticorpo anti-ApoC3 humanizado à ApoC3 imobilizado

[00233] ApoC3 humano nativo biotinilado foi capturado em um chip SPR revestido com estreptavidina (GE Healthcare, cat. N° BR100032) a pH 7,4, de acordo com o método provido por Biacore, por injeção de 20 µl a 10 µg/ml de humano nativo

biotinilado ApoC3 atingindo a densidade superficial de aproximadamente 500 RU. 60 µL de anticorpo de teste na faixa de 1-50 nM diluído em tampão HBS-EP (GE, cat #BR-1008-26; HEPES 0,010 M, NaCl 0,150M, EDTA 3 mM, tensoativo P20 a 0,05% (v/v), pH 7,4) foram injetados e passado através das células de fluxo a uma vazão de 30 µl/min, seguido de uma lavagem de dissociação a pH 7,4 por 5 minutos. Após a dissociação, as superfícies das células de fluxo foram regeneradas injetando 10 µL de NaOH 10 mM/NaCl 1 M e 10 µL de glicina 10 mM a pH 1,5. O ensaio foi repetido a pH 5,5 usando o mesmo protocolo geral, em que o tampão de diluição da corrida e da amostra foi substituído por um tampão HBS-EP suplementado com tampão de citrato até concentração final de 10 mM e o pH ajustado para 5,5.

[00234] Os sensogramas resultantes foram analisados usando o software BIAevaluation 4.1 usando o modelo de ligação Langmuir 1:1 para derivar a cinética de ligação. Os dados foram ajustados a zero e os diagramas sensoriais de células de referência foram subtraídos. Os sensogramas foram duplamente referenciados ao ensaio em branco sem analito. Os parâmetros ajustados foram considerados não aplicáveis se os valores fora da taxa estivessem abaixo do limite de detecção de kd do equipamento: 1×10^{-6} l/s.

[00235] Uma visão geral dos parâmetros cinéticos calculados é apresentada na Tabela 16 para os anticorpos humanizados gerados. A Figura 3 mostra os sensogramas sobrepostos para cada mAb humanizado gerado nos dois valores de pH do ensaio, em concentrações uniformes de 25 nM de mAb.

Tabela 16. Análise SPR da ligação do anticorpo ApoC3 humanizado a ApoC3 imobilizado

Anticorpo	HBS-EP	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Conc de analito	KA (1/M)	K_D (M)	K_D (nM)	K_D pH 5,5/K_D pH 7,4
5E5	pH 7,4	3,50E+05	1,79E-05	475	50nM-0,8nM	1,95E+10	5,12E-11	0,05	0,97
	pH 5,5	3,40E+05	1,70E-05	519	50nM-0,8nM	2,01E+10	4,99E-11	0,05	
5E5VH5_VL8	pH 7,4	1,77E+05	1,73E-04	309	50nM-0,8nM	1,03E+09	9,75E-10	0,98	11,7
	pH 5,5	2,11E+05	2,42E-03	183	50nM-0,8nM	8,74E+07	1,14E-08	11,40	
5E5VH12	pH 7,4	6,56E+05	1,12E-05	598	25nM-0,8nM	5,84E+10	1,71E-11	0,02	27,6
	pH 5,5	3,02E+05	1,43E-04	684	50nM-0,8nM	2,12E+09	4,72E-10	0,47	
mAb1	pH 7,4	2,61E+05	1,18E-05	692	50nM-0,8nM	2,20E+10	4,54E-11	0,05	5,22
	pH 5,5	4,40E+05	1,04E-04	669	25nM-0,8nM	4,23E+09	2,37E-10	0,24	
mAb2	pH 7,4	2,45E+05	1,35E-05	696	50nM-0,8nM	1,81E+10	5,52E-11	0,06	5,13
	pH 5,5	4,35E+05	1,23E-04	668	25nM-0,8nM	3,54E+09	2,83E-10	0,28	
mAb3	pH 7,4	2,12E+05	2,33E-05	697	50nM-0,8nM	9,11E+09	1,10E-10	0,11	3,19
	pH 5,5	3,63E+05	1,27E-04	673	25nM-0,8nM	2,85E+09	3,51E-10	0,35	
mAb4	pH 7,4	2,43E+05	1,13E-06	671	50nM-0,8nM	2,15E+11	4,64E-12	n.a.	n.a.
	pH 5,5	4,16E+05	1,56E-04	648	25nM-0,8nM	2,67E+09	3,74E-10	0,37	
mAb5	pH 7,4	2,37E+05	3,51E-05	668	50nM-0,8nM	6,76E+09	1,48E-10	0,15	2,33
	pH 5,5	4,19E+05	1,45E-04	628	25nM-0,8nM	2,90E+09	3,45E-10	0,35	
mAb6	pH 7,4	2,22E+05	1,33E-05	680	50nM-0,8nM	1,67E+10	5,99E-11	0,06	5,79
	pH 5,5	4,25E+05	1,48E-04	608	25nM-0,8nM	2,88E+09	3,47E-10	0,35	
mAb7	pH 7,4	3,64E+05	3,37E-05	773	50nM-0,8nM	1,08E+10	9,28E-11	0,09	52,7
	pH 5,5	6,56E+05	3,21E-03	523	25nM-0,8nM	2,05E+08	4,89E-09	4,89	
mAb8	pH 7,4	2,37E+05	2,41E-05	537	50nM-0,8nM	9,83E+09	1,02E-10	0,10	7,34
	pH 5,5	4,90E+05	3,67E-04	558	25nM-0,8nM	1,34E+09	7,49E-10	0,75	
mAb9	pH 7,4	2,23E+05	3,32E-05	548	50nM-0,8nM	6,71E+09	1,49E-10	0,15	5,09
	pH 5,5	4,86E+05	3,69E-04	566	25nM-0,8nM	1,32E+09	7,59E-10	0,76	
mAb10	pH 7,4	2,21E+05	2,12E-05	617	50nM-0,8nM	1,05E+10	9,56E-11	0,10	2,82
	pH 5,5	4,17E+05	1,13E-04	557	25nM-0,8nM	3,70E+09	2,70E-10	0,27	

Anticorpo	HBS-EP	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Conc de analito	KA (1/M)	K_D (M)	K_D (nM)	K_D pH 5,5/K_D pH 7,4
mAb11	pH 7,4	2,19E+05	3,80E-05	612	50nM-0,8nM	5,77E+09	1,73E-10	0,17	1,91
	pH 5,5	4,45E+05	1,47E-04	555	25nM-0,8nM	3,02E+09	3,31E-10	0,33	
mAb12	pH 7,4	2,28E+05	1,49E-05	635	50nM-0,8nM	1,53E+10	6,55E-11	0,07	2,12
	pH 5,5	4,83E+05	6,73E-05	530	25nM-0,8nM	7,18E+09	1,39E-10	0,14	
mAb13	pH 7,4	1,10E+05	4,61E-04	447	50nM-0,8nM	2,38E+08	4,19E-09	4,19	1,33
	pH 5,5	4,79E+05	2,67E-03	164	25nM-0,8nM	1,80E+08	5,56E-09	5,56	
mAb14	pH 7,4	1,44E+05	4,27E-04	423	50nM-0,8nM	3,38E+08	2,96E-09	2,96	7,20
	pH 5,5	3,70E+05	7,88E-03	115	25nM-0,8nM	4,70E+07	2,13E-08	21,30	
mAb15	pH 7,4	5,16E+05	2,77E-06	951	50nM-0,8nM	1,86E+11	5,38E-12	n.a.	n.a.
	pH 5,5	7,05E+05	2,49E-04	753	25nM-0,8nM	2,83E+09	3,53E-10	0,35	
mAb16	pH 7,4	5,46E+05	3,75E-04	813	50nM-0,8nM	1,46E+09	6,87E-10	0,69	10,8
	pH 5,5	1,63E+06	1,21E-02	282	25nM-0,8nM	1,34E+08	7,44E-09	7,44	
mAb17	pH 7,4	5,03E+05	2,33E-05	891	50nM-0,8nM	2,15E+10	4,64E-11	0,05	7,37
	pH 5,5	8,06E+05	2,76E-04	746	25nM-0,8nM	2,92E+09	3,42E-10	0,34	
mAb18	pH 7,4	6,28E+05	8,38E-04	721	50nM-0,8nM	7,49E+08	1,33E-09	1,33	6,48
	pH 5,5	1,79E+06	1,55E-02	179	25nM-0,8nM	1,16E+08	8,62E-09	8,62	
mAb19	pH 7,4	6,40E+05	2,90E-05	774	25nM-0,8nM	2,21E+10	4,53E-11	0,05	9,21
	pH 5,5	7,10E+05	2,96E-04	736	25nM-0,8nM	2,40E+09	4,17E-10	0,42	
mAb20	pH 7,4	8,31E+05	4,87E-04	649	25nM-0,8nM	1,71E+09	5,86E-10	0,59	16,11
	pH 5,5	2,27E+06	2,14E-02	202	25nM-0,8nM	1,06E+08	9,44E-09	9,44	

* o teste a pH 7,4 resultou em leitura de dissociação abaixo do limite de detecção do equipamento

n.a. não aplicável

[00236] Como mostrado na Figura 3, mAb1 a mAb6 demonstraram taxas de dissociação muito baixas em pH 7,4 e pH 5,5. Sua afinidade aparente em pH 5,5 foi melhorada em relação a 5E5VH5_VL8, e a ligação alvo dependente de pH não foi observada. O anticorpo mAb7 mostra uma ligação clara alvo dependente do pH, com alta taxa de dissociação em pH 5,5. No entanto, os valores de Rmax na fase de ligação em ambos os valores de pH foram maiores que o de 5E5VH5_VL8. Os anticorpos mAb8 a mAb12 demonstraram taxas de dissociação muito baixas em pH 7,4 e níveis mais altos de Rmax em pH 5,5 do que em pH 7,4. Sua afinidade aparente em pH 5,5 foi melhorada em relação a 5E5VH5_VL8, e a ligação alvo dependente de pH não foi observada. Os anticorpos mAb13 e mAb14 foram gerados enxertando as sequências HCDR e LCDR nas sequências estruturais da linha germinal humana mais próximas, e mostraram características claras de ligação alvo dependentes de pH. No entanto, sua afinidade com ApoC3 humano foi reduzida em pH 7,4 em relação a 5E5VH5_VL8. Os anticorpos mAb15, mAb17 e mAb19 não continham o resíduo histidina no LCDR3 (Q90H), mas exibiam as características de ligação alvo dependentes do pH desejadas na tela. As sequências de anticorpos mAb16, mAb18 e mAb20 foram idênticas a mAb15, mAb17 e mAb19, respectivamente, exceto que o resíduo correspondente a H90 5E5VH5_VL8 foi histidina. Como mostrado na Figura 3, o mAb16, o mAb18 e o mAb20 mostraram uma ligação clara alvo dependente do pH, devido à afinidade reduzida ao alvo em pH 5,5 e taxa de dissociação aumentada em pH 7,4.

5.2 Análise SPR da ligação de ApoC3 a anticorpos anti-ApoC3 humanizados imobilizados

[00237] Um ensaio de SPR invertido foi projetado no

qual um anticorpo de teste foi capturado em um chip de SPR, a proteína ApoC3 humana foi injetada, e a ligação de ApoC3 ao anticorpo foi medida. Especificamente, o anticorpo específico para IgG anti-humano de cabra Fcγ (Jackson ImmunoResearch, Cat. N° 109-005-098) foi imobilizado numa superfície de chip CM5 (GE Healthcare, cat. N° BR100012). A imobilização foi realizada de acordo com o método providos pela Biacore/GE usando o kit NHS/EDC (Biacore AB, Cat. n° BR-1000-50): após a ativação do chip, uma solução de 30 µg/ml de anticorpo Fcγ anti-humano em tampão de acetato 10 mM com pH de 5,0 foi preparado e injetado até a densidade superficial atingir aproximadamente 10000 RU. O ciclo analítico compreendeu as seguintes etapas:

(1) captura de anticorpo: injeção do anticorpo em uma concentração de 50 nM a pH 7,4 ou pH 5,5 diluído em tampão HBS-EP (GE, cat. N° BR-1008-26; HEPES 0,010 M, NaCl 0,150M, EDTA 3mM, tensoativo P20 a 0,05% (v/v), pH 7,4) e permitindo ser capturado pelo anticorpo anti huFcγ de alta afinidade até 800 RUs;

(2) estabilização da linha de base: injeção de 100 µl de tampão HBS-EP na vazão de 30 µl/ml;

(3) ligação alvo: injeção de 60 µl da proteína de ApoC3 alvo diluída em tampão HBS-EP a concentrações de 400 nM, 200 nM, 100 nM e 50 nM;

(4) lavagem de dissociação: injeção de tampão HBS-EP a uma vazão de 30 µl/ml por 5 min para avaliação da fase de dissociação;

(5) regeneração do chip injetando 20 µl de glicina 10 mM a pH 1,5.

[00238] Os sensogramas resultantes foram analisados

usando o software BIAevaluation 4.1 usando o modelo de ligação Langmuir 1:1 para derivar a cinética de ligação. Os dados foram ajustados a zero, os sensogramas de células de referência foram subtraídos e o ensaio em branco do analito foi usado para fazer referência dupla aos sensogramas correspondentes às injeções do analito. Os sensores de fase de dissociação e associação foram ajustados separadamente para as 4 curvas de concentração diferentes. Os sensogramas foram excluídos do ajuste se os valores máximos de RU atingidos estivessem abaixo do limite de detecção do equipamento (<5RU), Biacore 3000 (Biacore AB).

[00239] Uma visão geral dos parâmetros cinéticos calculados é apresentada na Tabela 17 para os anticorpos humanizados gerados. A Figura 4 mostra as características de ligação para as variantes geradas. A taxa de dissociação de cada anticorpo aumentou nesta configuração, devido à diferente apresentação da proteína alvo.

Tabela 17. Análise SPR da ligação de ApoC3 a anticorpos anti-ApoC3 humanizados e imobilizados.

Anticorpo	HBS-EP	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Conc de alvo	KA (1/M)	K_D (M)	K_D (nM)	K_D (nM) pH5.5/ pH7.4
5E5VH5_VL8	pH 7,4	4,27E+04	1,27E-02	68,1	600 - 50 nM	3,35E+06	2,98E-07	298	n/a
	pH 5,5	n/a	n/a	n/a	600 - 50 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb1	pH 7,4	5,76E+04	4,26E-03	86,4	600 - 50 nM	1,35E+07	7,39E-08	74	3,42
	pH 5,5	1,01E+05	2,57E-02	129	600 - 50 nM	3,95E+06	2,53E-07	253	
mAb2	pH 7,4	4,45E+04	4,60E-03	86,3	600 - 50 nM	9,69E+06	1,03E-07	103	2,82
	pH 5,5	9,66E+04	2,81E-02	124	600 - 50 nM	3,44E+06	2,90E-07	290	
mAb3	pH 7,4	3,34E+04	5,82E-03	90	600 - 50 nM	5,75E+06	1,74E-07	174	1,86
	pH 5,5	1,02E+05	3,30E-02	105	600 - 50 nM	3,09E+06	3,23E-07	323	
mAb4	pH 7,4	4,55E+04	5,65E-03	71,7	600 - 50 nM	8,06E+06	1,24E-07	124	3,48
	pH 5,5	8,31E+04	3,59E-02	117	600 - 50 nM	2,32E+06	4,32E-07	432	
mAb5	pH 7,4	3,51E+04	6,37E-03	75,3	600 - 50 nM	5,51E+06	1,81E-07	181	2,25
	pH 5,5	9,20E+04	3,76E-02	49,2	600 - 50 nM	2,45E+06	4,08E-07	408	
mAb6	pH 7,4	4,09E+04	6,72E-03	67,8	600 - 50 nM *	6,08E+06	1,65E-07	165	5,22
	pH 5,5	9,31E+04	8,02E-02	95,8	600 - 50 nM	1,16E+06	8,61E-07	861	
mAb7	pH 7,4	4,85E+04	1,20E-02	83,8	600 - 50 nM	4,05E+06	2,47E-07	247	2,36
	pH 5,5	1,11E+05	6,46E-02	36,0	600 - 50 nM	1,71E+06	5,83E-07	583	
mAb8	pH 7,4	3,21E+04	7,72E-03	62,4	600 - 50 nM **	4,15E+06	2,41E-07	241	1,00
	pH 5,5	8,46E+04	2,05E-02	99	600 - 100 nM	4,13E+06	2,42E-07	242	
mAb9	pH 7,4	2,88E+04	6,69E-03	69,8	600 - 50 nM	4,31E+06	2,32E-07	232	2,33
	pH 5,5	8,63E+04	4,67E-02	96,4	600 - 50 nM	1,85E+06	5,41E-07	541	
mAb10	pH 7,4	3,19E+04	6,01E-03	64,1	600 - 50 nM **	5,30E+06	1,89E-07	189	1,77
	pH 5,5	8,21E+04	2,74E-02	91,7	600 - 50 nM	2,99E+06	3,34E-07	334	
mAb11	pH 7,4	4,04E+04	5,23E-03	57,5	600 - 50 nM	7,73E+06	1,29E-07	129	3,90
	pH 5,5	8,05E+04	4,05E-02	82,6	600 - 50 nM	1,99E+06	5,03E-07	503	
mAb12	pH 7,4	2,04E+04	6,55E-03	90,8	600 - 50 nM **	3,12E+06	3,21E-07	321	1,07
	pH 5,5	7,32E+04	2,51E-02	99	600 - 50 nM	2,91E+06	3,43E-07	343	

Anticorpo	HBS-EP	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	Conc de alvo	KA (1/M)	K_D (M)	K_D (nM)	K_D (nM) pH5.5/ pH7.4
mAb13	pH 7,4	3,70E+04	3,70E-02	28,5	600 - 50 nM	9,98E+05	1,00E-06	1000	n/a
	pH 5,5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb14	pH 7,4	2,60E+04	4,58E-02	42,8	600 - 50 nM	5,67E+05	1,76E-06	1760	n/a
	pH 5,5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb15	pH 7,4	1,09E+05	3,78E-03	64,5	600 - 50 nM **	2,88E+07	3,47E-08	35	2,48
	pH 5,5	1,34E+05	1,16E-02	122	600 - 50 nM	1,16E+07	8,62E-08	86	
mAb16	pH 7,4	7,81E+04	4,66E-02	70,5	600 - 100 nM	1,68E+06	5,96E-07	596	n/a
	pH 5,5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb17	pH 7,4	9,87E+04	6,16E-03	62,7	600 - 50 nM **	1,60E+07	6,24E-08	62	4,12
	pH 5,5	8,45E+04	2,17E-02	118	600 - 50 nM	3,89E+06	2,57E-07	257	
mAb18	pH 7,4	1,06E+05	5,39E-02	38,4	600 - 50 nM	1,97E+06	5,09E-07	509	n/a
	pH 5,5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb19	pH 7,4	1,30E+05	4,63E-03	70,3	600 - 50 nM	2,82E+07	3,55E-08	36	4,42
	pH 5,5	1,27E+05	1,98E-02	103	600 - 50 nM	6,37E+06	1,57E-07	157	
mAb20	pH 7,4	5,51E+04	7,37E-02	98,9	600 - 50 nM	7,47E+05	1,34E-06	1340	n/a
	pH 5,5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	

Os sensogramas foram subtraídos ao canal em branco e com dupla referência ao ensaio em branco sem analito.

n/a: não aplicável

* com exceção do sensograma de 400nM

** com exceção do sensograma de 200nM

[00240] Como mostrado na Figura 4, mAb1 ao mAb6 mostraram uma afinidade aparente melhorada a ApoC3 a pH 7,4, e foi observada a ligação alvo dependente do pH. O anticorpo mAb7 mostrou uma ligação clara ao alvo dependente do pH, com alta taxa de dissociação em ambos os valores de pH. O valor de Rmax a pH 5,5 na fase de associação foi aumentado em relação a 5E5VH5_VL8. Os anticorpos mAb8 a mAb12 demonstraram menores taxas de dissociação a pH 7,4 que 5E5VH5_VL8, níveis mais altos de Rmax a pH 5,5 do que em pH 7,4, maiores taxas de dissociação a pH 5,5 que o de 5E5VH5_VL8 e ligação alvo dependente de pH. Os anticorpos mAb13 e mAb14 (gerados pelo enxerto das sequências HCDR e LCDR nas sequências estruturais de linhas germinais humanas mais próximas) mostraram perda de ligação em ambos os níveis de pH e, portanto, os valores de afinidade em pH 5,5 não foram calculados. Os anticorpos mAb16, mAb18 e mAb20 mostraram uma ligação clara alvo dependente de pH, devido à afinidade reduzida em relação ao alvo em pH 5,5, no entanto, suas taxas de dissociação em pH 7,4 também foram aumentadas.

[00241] Em resumo, os seguintes grupos de perfis de ligação foram identificados para os anticorpos humanizados de acordo com os resultados do ensaio de SPR:

Grupo 1: mAbs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 e 12;

Grupo 2: mAbs 15, 17 e 19;

Grupo 3: mAbs 16, 18 e 20;

Grupo 4: continha o mAb 7; e

Grupo 5: mAbs 13 e 14.

[00242] Dentro de cada grupo, todas as variantes mostraram associação de SPR semelhante e perfil de dissociação. Portanto, um anticorpo representativo de cada

grupo foi selecionado para avaliar sua termotolerância, como um de seus parâmetros de desenvolvimento, com base nos critérios do maior percentual de homologia humana.

5.3 Caracterização da termotolerância de anticorpos anti-ApoC3 humanizados selecionados

[00243] A termotolerância de anticorpos humanizados foi avaliada após incubação em diferentes temperaturas na faixa de 56 a 68°C por 1 h. A atividade dos anticorpos foi determinada em um ensaio de SPR no qual 500 RU da proteína huApoC3 nativa foram imobilizadas em um chip CM5 (GE Healthcare, cat. N° BR100012). A imobilização foi realizada de acordo com o método provido pela Biacore usando o kit NHS/EDC (Biacore AB): após a ativação do chip, foi preparada uma solução de 60 µg/ml de ApoC3 humana em tampão acetato 10 mM a pH 4,5 e injetado até a densidade superficial atingir aproximadamente 500 RU.

[00244] 100 µL de anticorpo de teste a 10 nM diluído em tampão HBS-EP (GE, cat# BR-1008-26; HEPES 0,010 M, NaCl 0,150M, EDTA 3mM, tensoativo P20 a 0,05% (v/v), pH 7,4) foi injetado e passado através das células de fluxo a uma vazão de 30 µl/min, seguido de uma lavagem de dissociação com o tampão HBS-EP a pH 7,4 por 10 minutos. Após a dissociação, as superfícies das células de fluxo foram regeneradas injetando 10 µL de NaOH 10 mM/NaCl 1 M e 10 µL de glicina 10 mM a pH 1,5.

[00245] A taxa de associação e o valor máximo de RU atingido na fase de ligação foram medidos como o parâmetro de leitura. A taxa de associação (inclinação) foi avaliada na fase inicial de ligação até 200 segundos e o valor máximo da RU (R0) foi lido no início da fase de dissociação aos

345s. A porcentagem de anticorpos funcionais foi calculada com base na referência (amostra incubada a 4°C) definida em 100%. A temperatura de fusão de cada anticorpo foi determinada como o ponto de inflexão nas curvas de atividade versus temperatura.

[00246] Como mostrado nas Figuras 5A e 5B, e conforme listado na Tabela 18, a maioria dos anticorpos humanizados testados mostrou temperaturas de fusão significativamente melhoradas em comparação com o clone parental 5E5VH5_VL8. No entanto, o mAb14 teve uma temperatura de fusão significativamente menor do que 5E5VH5_VL8.

Tabela 18. Temperaturas de fusão de anticorpos anti-ApoC3 humanizados.

Anticorpo Anti-ApoC3	**Temperatura de Fusão, °C (EC50)**
5E5VH5_VL8	62,9
mAb7	64,2
mAb9	65,9
mAb14	57,1
mAb17	65,9
mAb18	61,8

[00247] A termotolerância do mAb13 também foi avaliada no ensaio anterior para determinar se a alteração observada na termotolerância estava relacionada à sequência da estrutura da linha germinal usada para o enxerto de CDR das variantes 13 e 14. O ensaio foi realizado em uma faixa de temperatura estendida para cobrir a temperatura de fusão esperada dos anticorpos humanizados e de 5E5VH5_VL8 (submetido a ensaio como controle). Como mostrado na Figura 5C, o mAb13 e o mAb14 tinham curvas de termotolerância semelhantes e exibiram temperaturas de fusão de cerca de 57°C, cerca de 6°C menores que as de 5E5VH5_VL8.

[00248] A invenção não deve ser limitada em escopo pelas modalidades específicas divulgadas nesse documento. De fato, várias modificações da invenção além das descritas serão evidentes para os habilitados na técnica a partir da descrição anterior e das figuras anexas. Tais modificações devem estar dentro do escopo das reivindicações anexas.

[00249] Todas as referências (*por exemplo*, publicações ou patentes ou pedidos de patentes) citadas nesse documento são incorporadas nesse documento por referência em sua totalidade e para todos os fins na mesma extensão como se cada referência individual (*por exemplo*, publicação ou pedido de patente ou patente) fosse especificamente e indicado individualmente para ser incorporado por referência em sua totalidade para todos os fins.

[00250] Outras modalidades estão dentro das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo as regiões determinantes da complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável da cadeia leve compreendendo as regiões determinantes da complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTX$_1$X$_2$GGTAYRDSVKG, em que X$_1$ é G, E ou D, e X$_2$ é G ou A (SEQ ID NO: 87);

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, em que X é D ou G (SEQ ID NO: 88);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AXGTYYPHT, em que X é Q ou H (SEQ ID NO: 8), e

em que CDRH1, CDRH2 e CDRH3 do anticorpo não são SEQ ID NOs: 3, 9, 10; 3, 11, 10; 3, 9, 12; ou 3, 11, 12, respectivamente.

2. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38) ou SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39).

3. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1 ou

2, caracterizado pelo fato de que CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) ou KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40).

4. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) ou AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

5. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 3, 36, 10, 6, 7, e 14; 3, 37, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 40, 7 e 14; 3, 38, 10, 6, 7 e 14; 3, 39, 10, 6, 7 e 14; ou 3, 37, 10, 40, 7 e 13, respectivamente.

6. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 42-53.

7. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 54-65.

8. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que se liga especificamente a ApoC3, o anticorpo compreendendo uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve, em que a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve, respectivamente, compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas em SEQ ID NOs: 42

e 54, 43 e 55, 44 e 56, 45 e 57, 46 e 58, 46 e 54, 47 e 58, 47 e 54, 48 e 58, 48 e 54, 49 e 59, 49 e 60, 50 e 59, 50 e 60, 51 e 61, 52 e 62, 53 e 62, 43 e 63, 44 e 64 ou 45 e 65.

9. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humanizado.

10. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende adicionalmente uma região constante humana.

11. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a região constante é uma variante de uma região constante da cadeia pesada de imunoglobulina humana do tipo selvagem, e em que a região constante da cadeia pesada da imunoglobulina humana variante tem uma afinidade aumentada para o receptor Fc neonatal humano (FcRn) em pH 6 em relação à afinidade da região constante da cadeia pesada de imunoglobulina humana do tipo selvagem para FcRn humano a pH 6.

12. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que a região constante é uma região constante da cadeia pesada de uma IgG humana.

13. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a região constante é uma região constante da cadeia pesada de uma IgG_1, IgG_2 ou IgG_4 humana.

14. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, caracterizado pelo fato de que a região constante compreende os aminoácidos K, F e Y nas posições da EU 433, 434 e 436, respectivamente.

15. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, caracterizado pelo fato de que a região constante compreende os aminoácidos Y, T e E nas posições da EU 252, 254 e 256, respectivamente.

16. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, caracterizado pelo fato de que a região constante compreende os aminoácidos L e S nas posições da EU 428 e 434, respectivamente.

17. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, caracterizado pelo fato de que a região constante compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 22-24, 76-78 e 81-86.

18. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 66-73.

19. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 74.

20. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que a cadeia pesada e a cadeia leve, respectivamente, compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 66 e 74, 67 e 74, 68 e 74, 69 e 74, 70 e 74, 71 e 74, 72 e 74, ou 73 e 74, respectivamente.

21. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das

reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o ApoC3 é ApoC3 humano.

22. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes e um carreador farmaceuticamente aceitável.

23. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica a região variável da cadeia pesada e/ou a região variável da cadeia leve do anticorpo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1-21.

24. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 23.

25. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 23 ou o vetor de expressão como definido na reivindicação 24.

26. Método para produzir um anticorpo que se liga a ApoC3, o método caracterizado pelo fato de que compreende a cultura da célula hospedeira como definida na reivindicação 25 sob condições que permitem a expressão do anticorpo.

27. Método para inibir a atividade de ApoC3 em um indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou da composição farmacêutica como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1-22.

28. Método para reduzir os níveis de triglicerídeos no sangue de um indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que compreende de administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou da composição farmacêutica como

definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1-22.

29. Método para inibir lipemia pós-prandial em um indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo ou da composição farmacêutica como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1-22.

30. Método para tratamento de hipertrigliceridemia em um indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo ou da composição farmacêutica como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1-22.

31. Método para tratamento de quilomicronemia em um indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo ou da composição farmacêutica como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1-22.

32. Método para reduzir o risco de doença cardiovascular em um indivíduo com hipertrigliceridemia, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou da composição farmacêutica como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1-22.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que compreende a doença cardiovascular é infarto do miocárdio.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a doença cardiovascular é angina.

35. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a doença cardiovascular é

acidente vascular cerebral.

36. Método, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a doença cardiovascular é aterosclerose.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo reduz os níveis de quilomícrons ou remanescentes de quilomícrons no sangue do indivíduo.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 36, caracterizado pelo fato de que o indivíduo está recebendo um agente redutor de lipídios adicional.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o agente redutor de lipídios adicional é um inibidor de HMG-CoA redutase.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o inibidor de HMG-CoA redutase é atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina ou sinvastatina.

41. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o agente redutor de lipídios adicional é um inibidor de PCSK9.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o inibidor de PCSK9 é alirocumabe, evolocumabe ou bococizumabe.

43. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o agente redutor de lipídios adicional é ezetimiba.

44. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o agente redutor de lipídios adicional é uma combinação de ezetimiba e um inibidor de

HMG-CoA redutase.

45. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o agente redutor de lipídios adicional é uma combinação de ezetimiba, um inibidor de HMG-CoA redutase e um inibidor de PCSK9.

Figura 1A

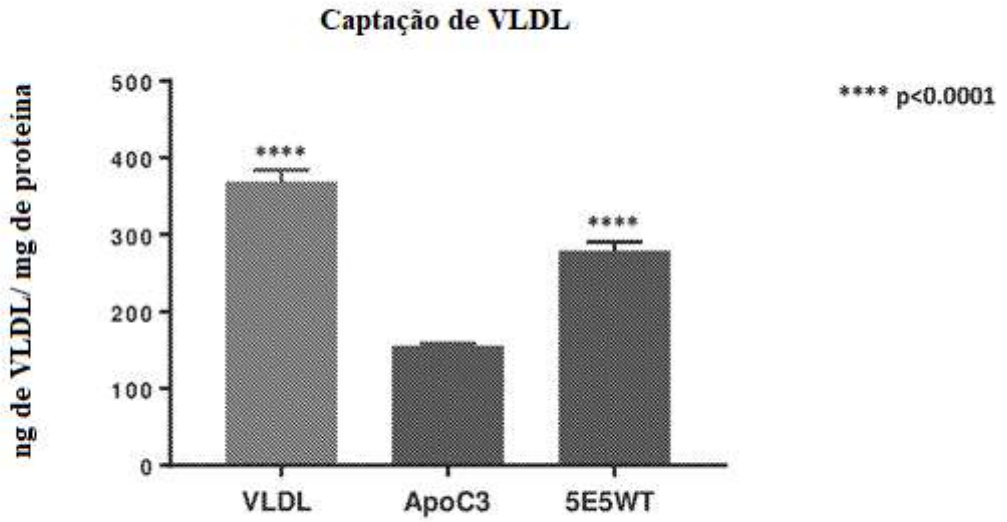
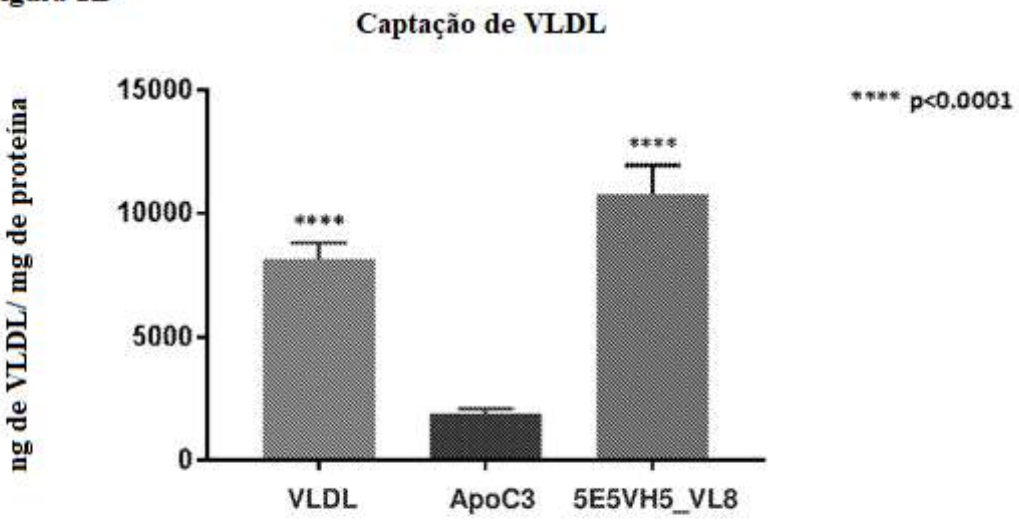


Figura 1B



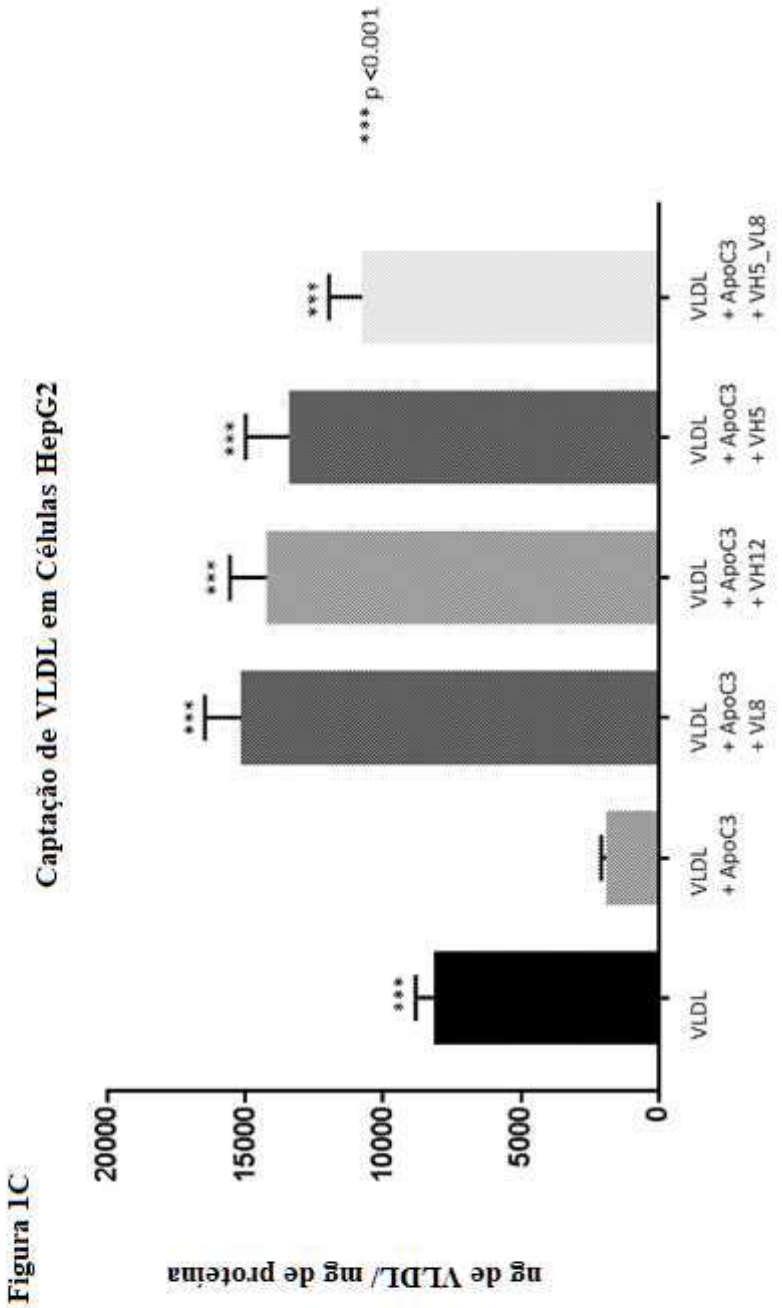

Captação de VLDL em Células HepG2
ng de VLDL/ mg de proteína
20000
15000
10000
5000
0
***
***
***
***
***
*** p <0.001
VLDL
VLDL + ApoC3
VLDL + ApoC3 + VL8
VLDL + ApoC3 + VH12
VLDL + ApoC3 + VH5
VLDL + ApoC3 + VH5_VL8

Figura 1C

Figura 2A

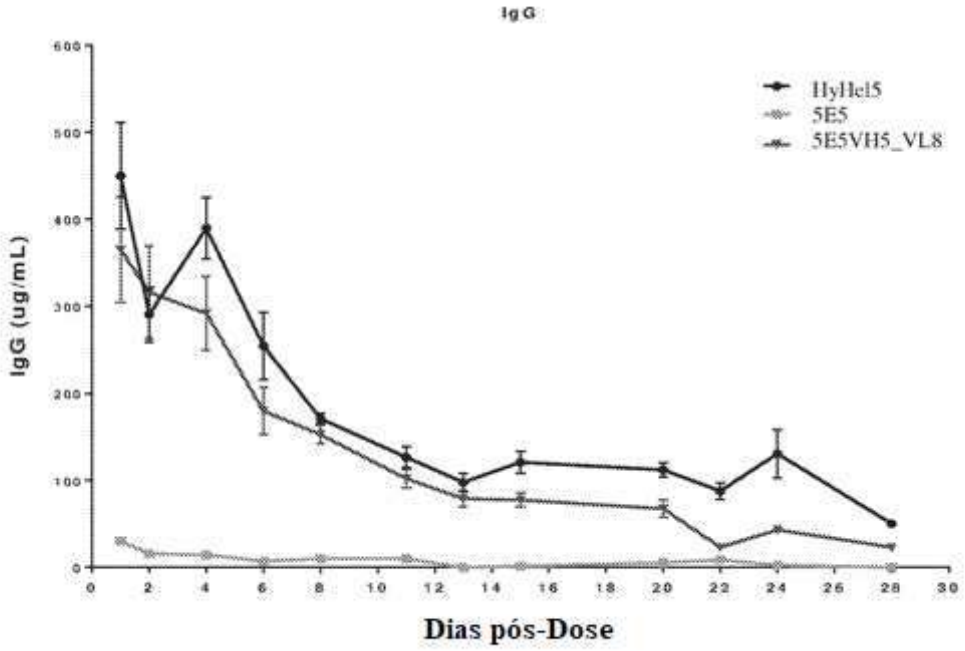

IgG
IgG (ug/mL)
Dias pós-Dose
HyHel5
5E5
5E5VH5_VL8
0
100
200
300
400
500
600
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30

Figura 2B

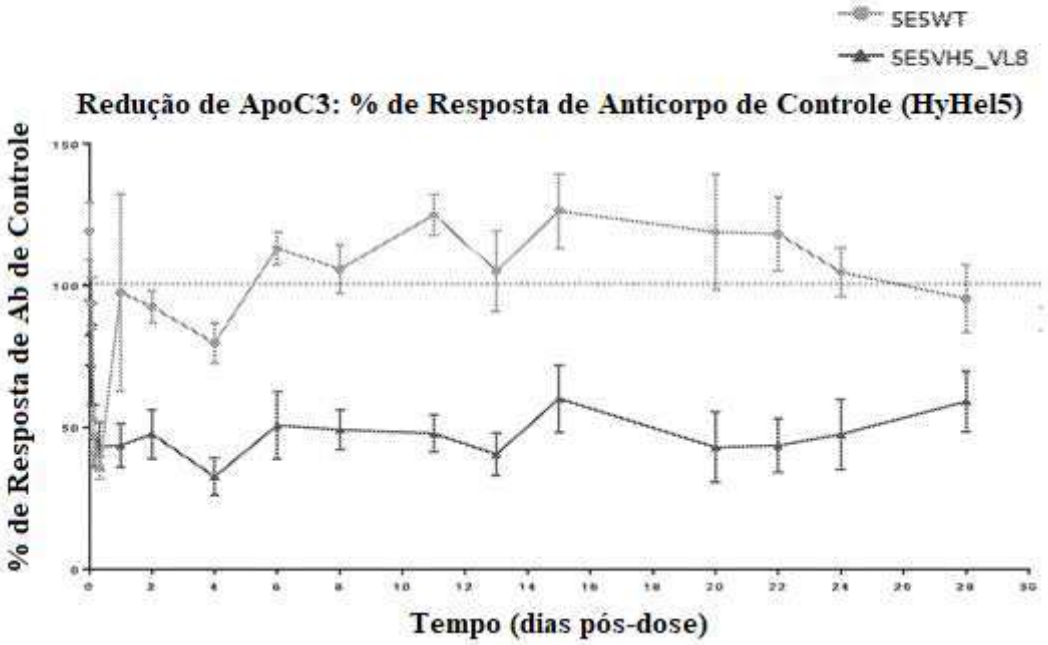


Figura 2C

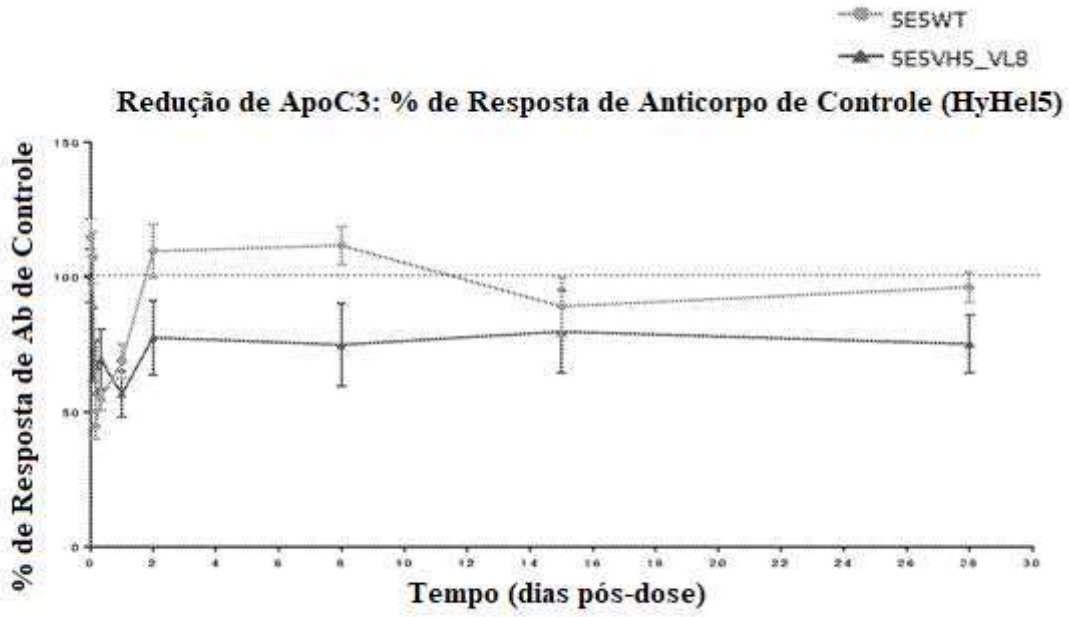


Figura 3

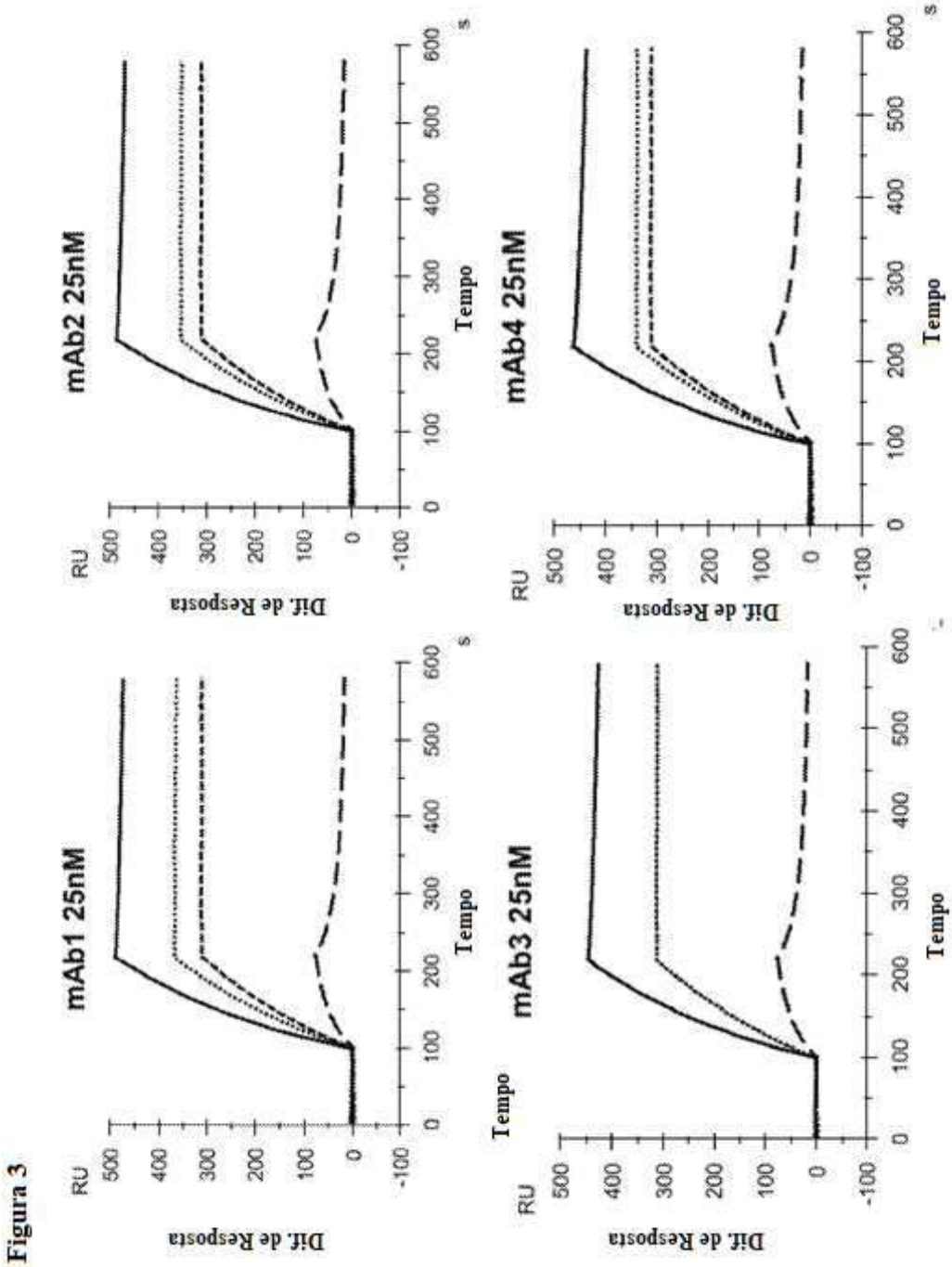

mAb1 25nM
mAb2 25nM
mAb3 25nM
mAb4 25nM
RU
Dif. de Resposta
Tempo
s
500
400
300
200
100
0
-100
0
100
200
300
400
500
600

Figura 3 (continuação)

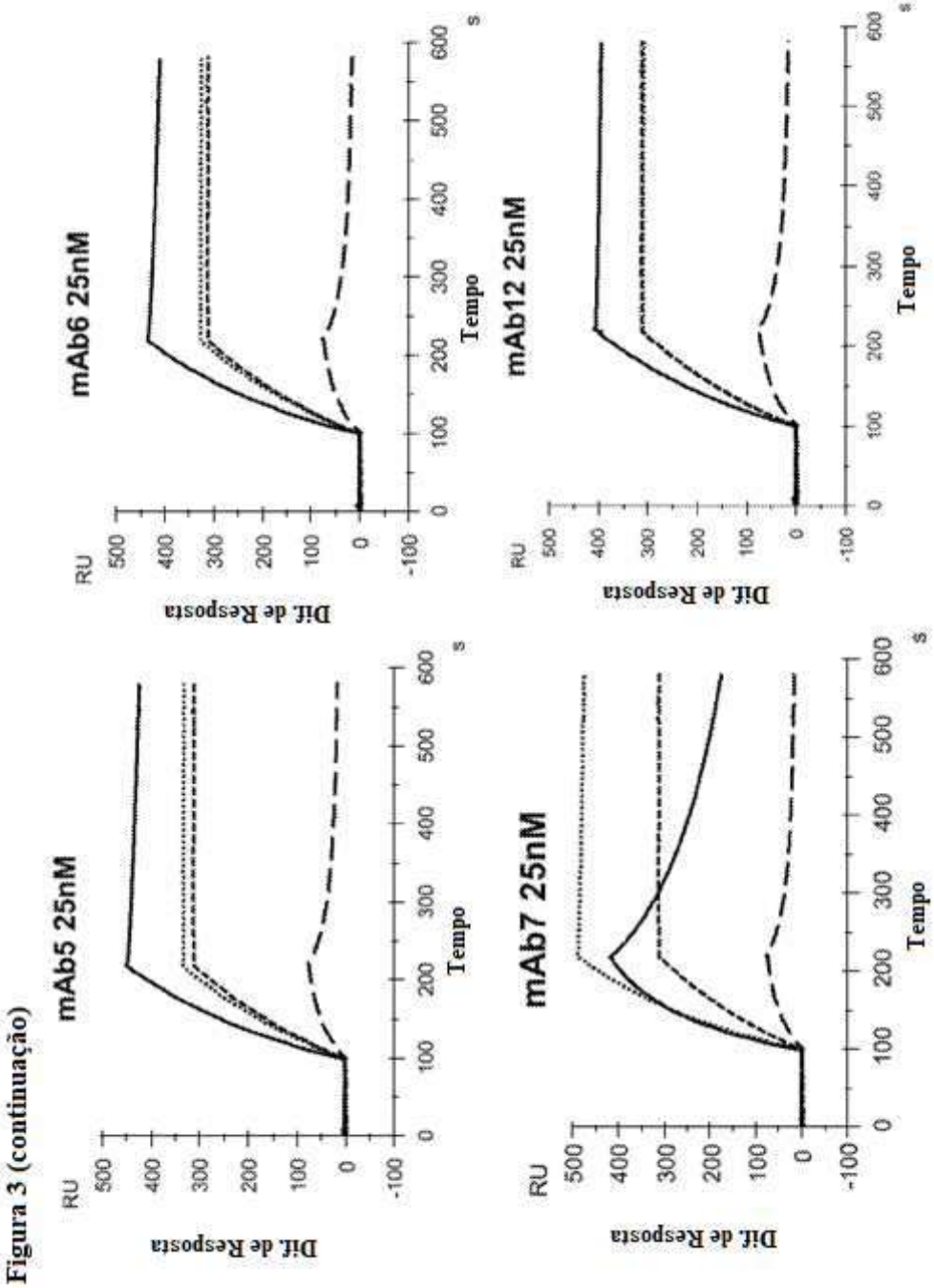


Figura 3 (continuação)

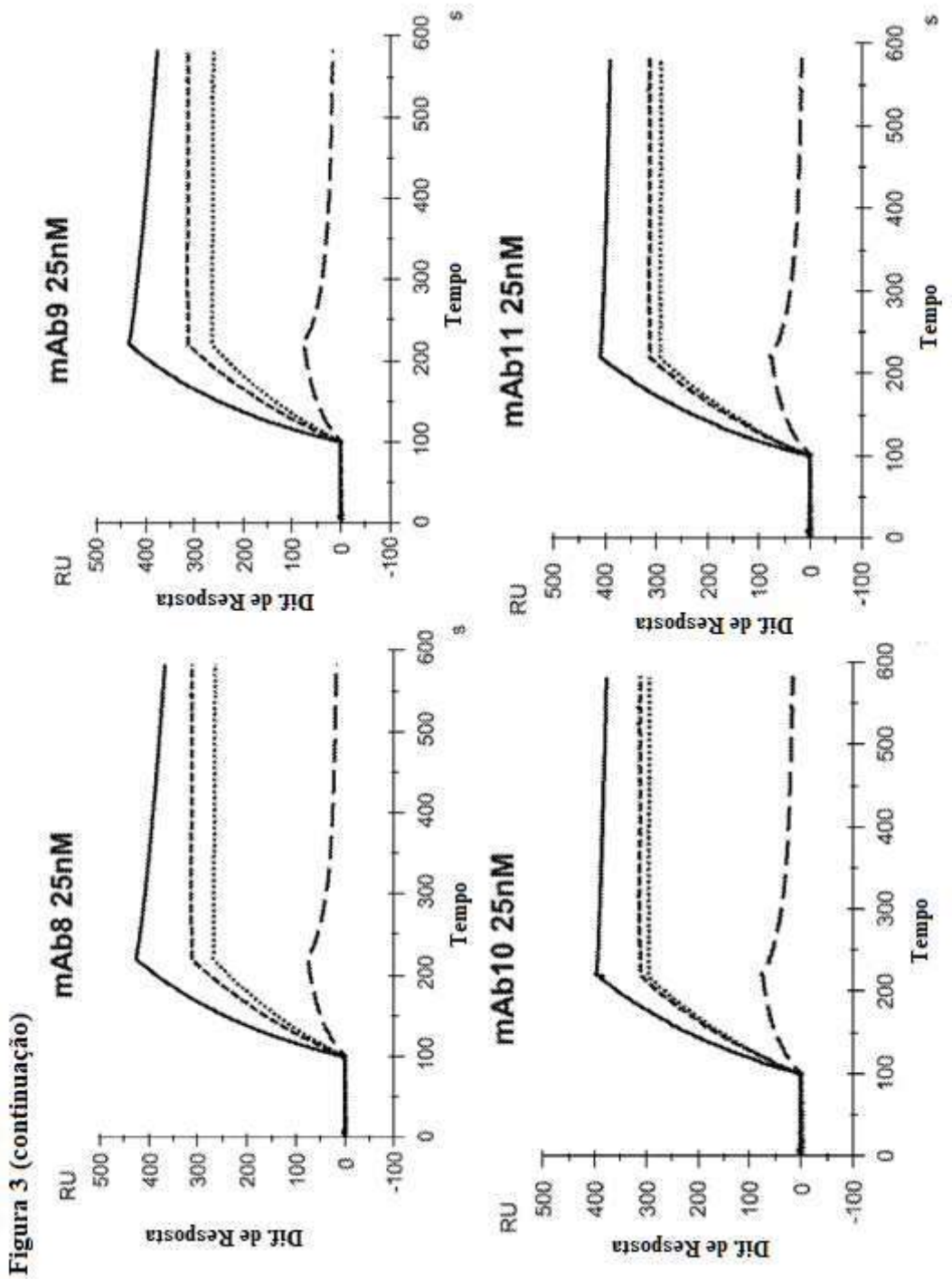


Figura 3 (continuação)

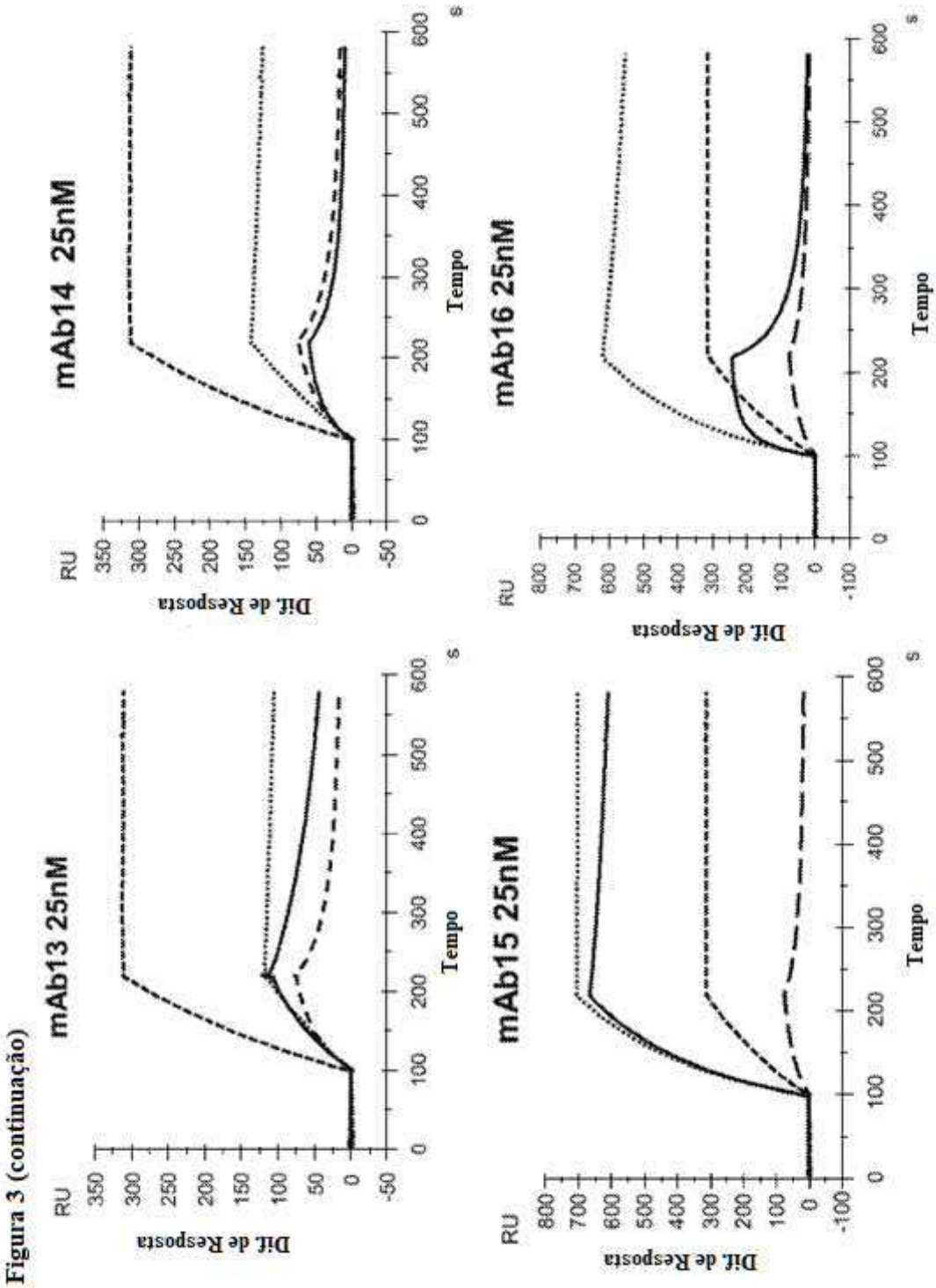


Figura 3 (continuação)

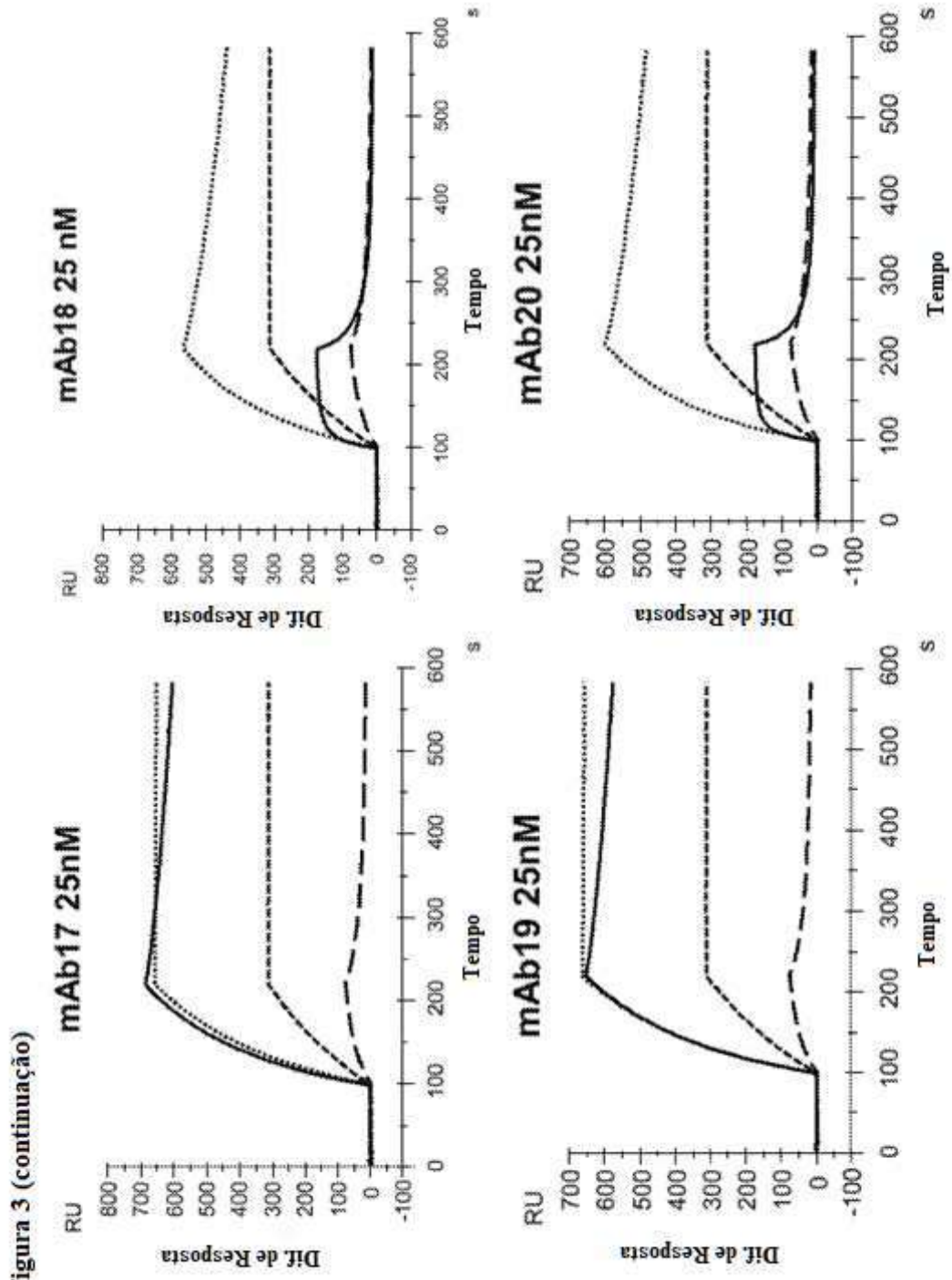


Figura 4

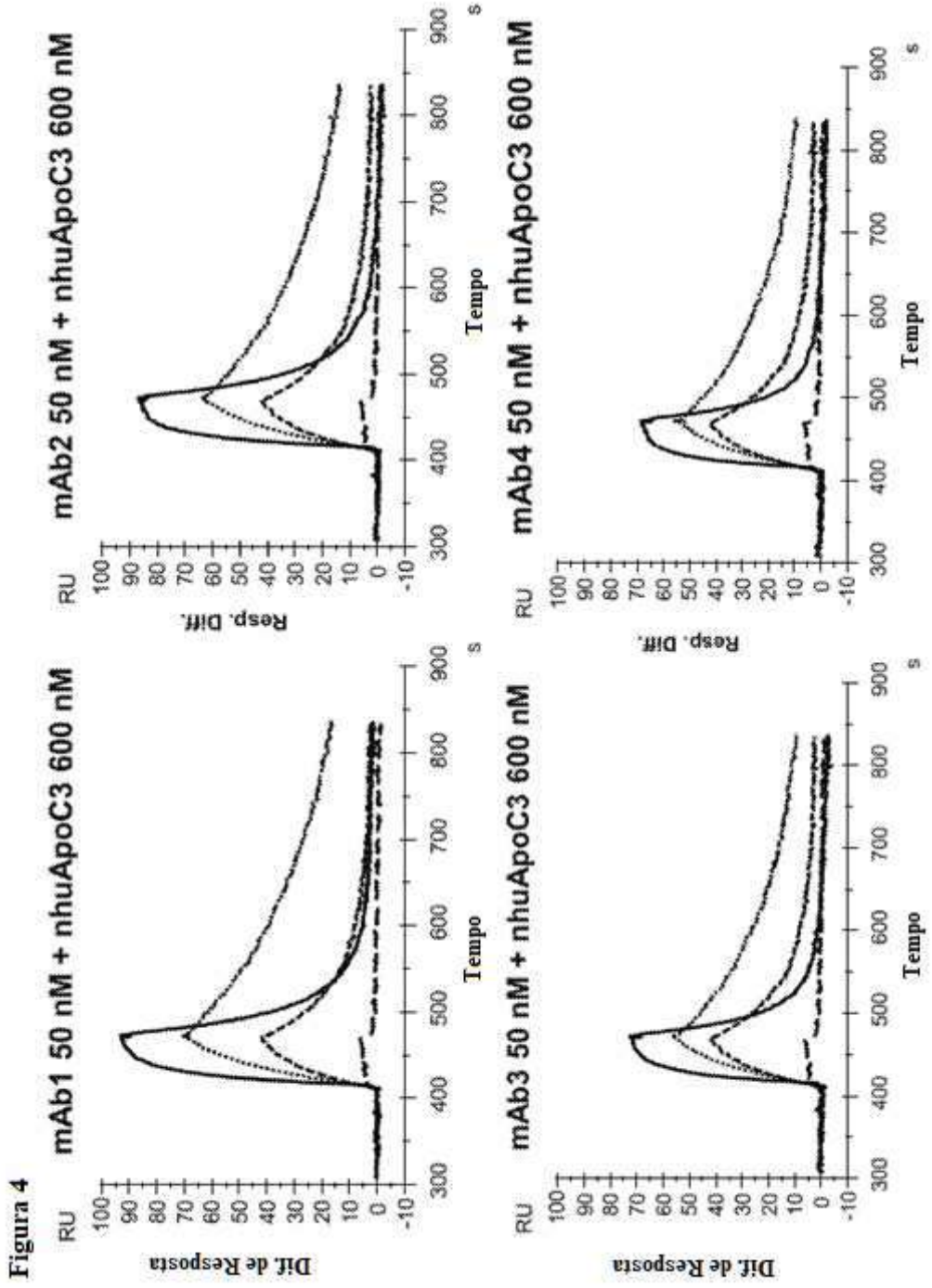

mAb1 50 nM + nhuApoC3 600 nM
mAb2 50 nM + nhuApoC3 600 nM
mAb3 50 nM + nhuApoC3 600 nM
mAb4 50 nM + nhuApoC3 600 nM
RU
Dif. de Resposta
Resp. Diff.
Tempo
s

Figura 4 (continuação)

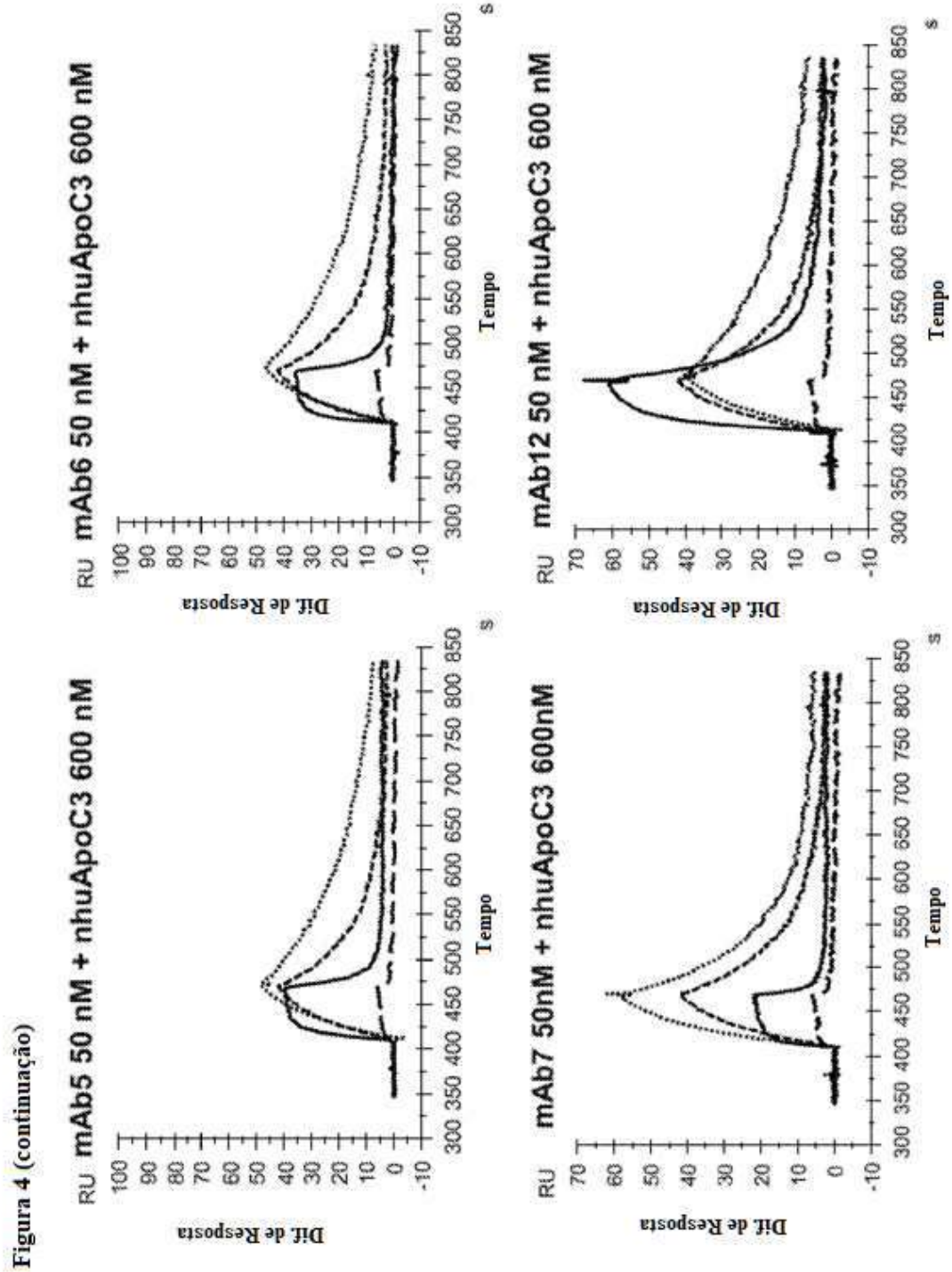


Figura 4 (continuação)

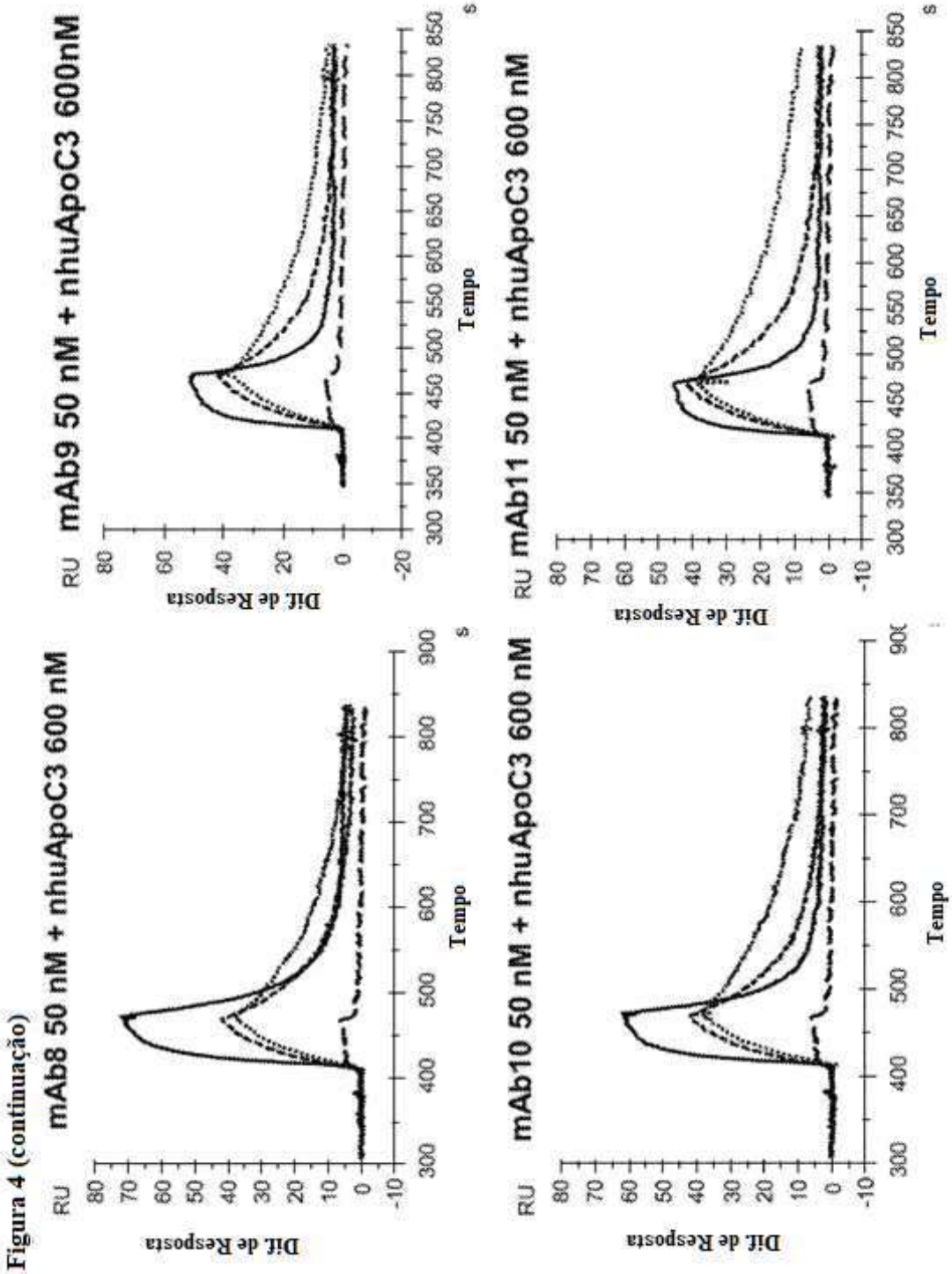


Figura 4 (continuação)

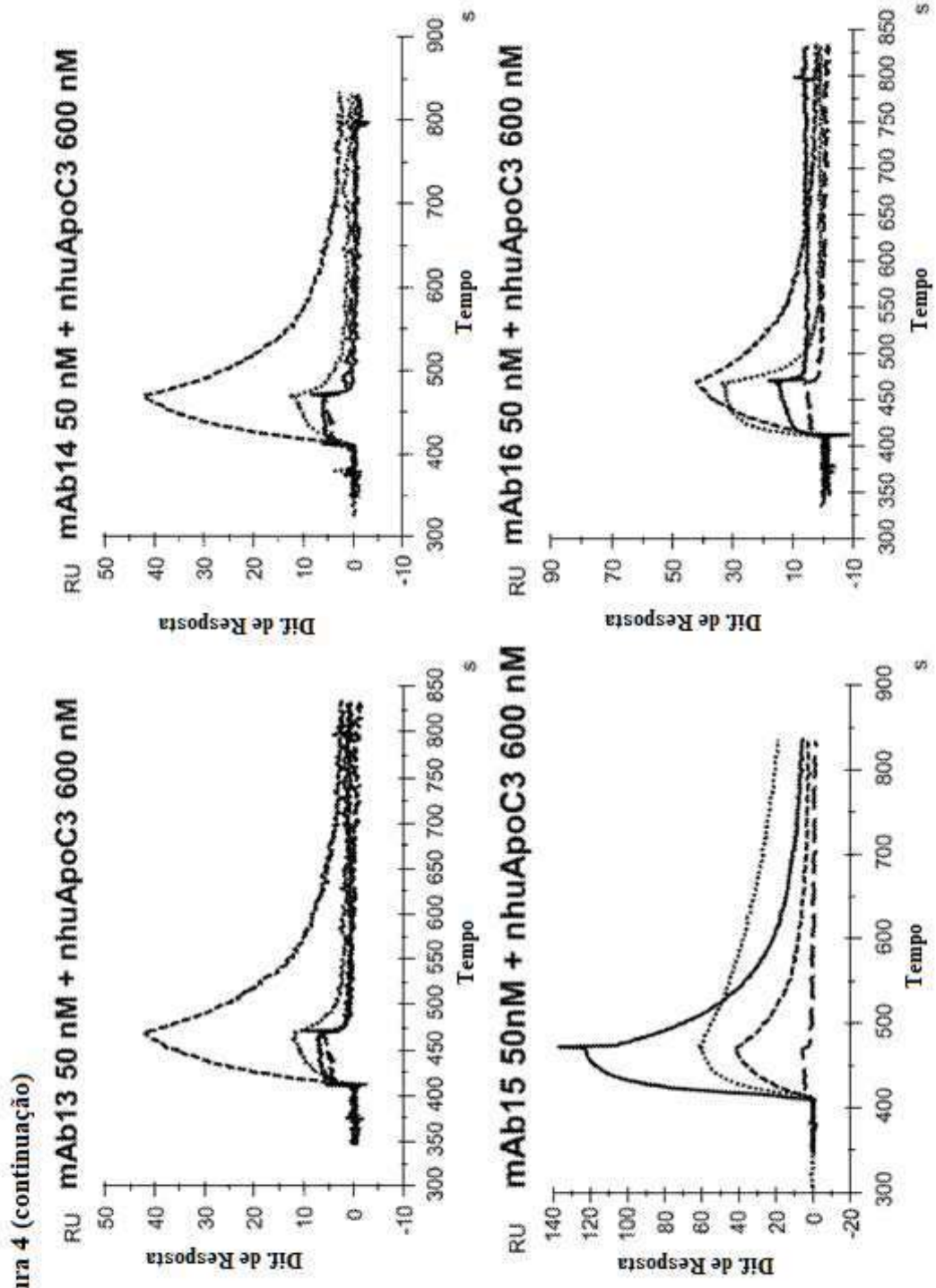


Figura 4 (continuação)

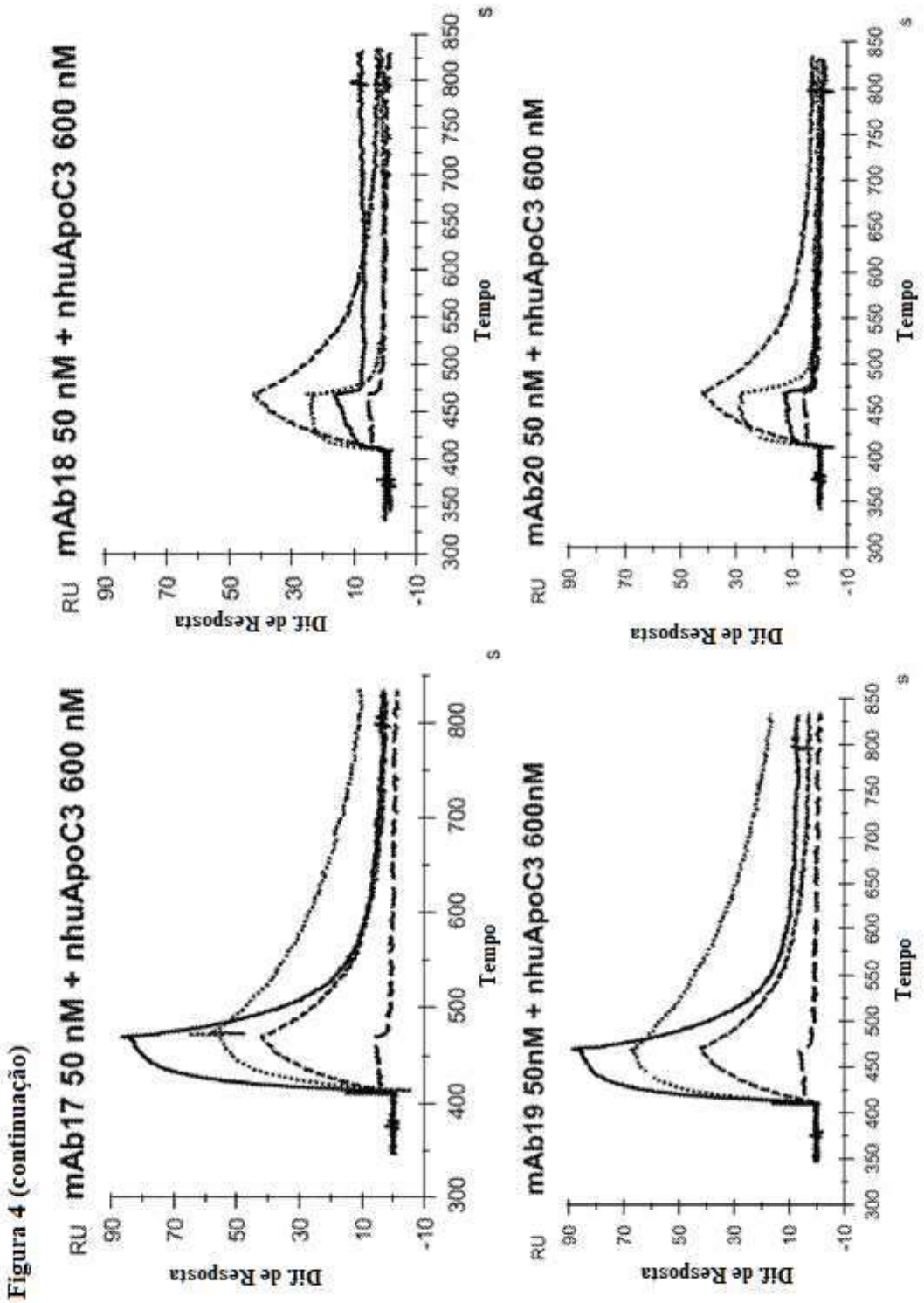


Figura 5A

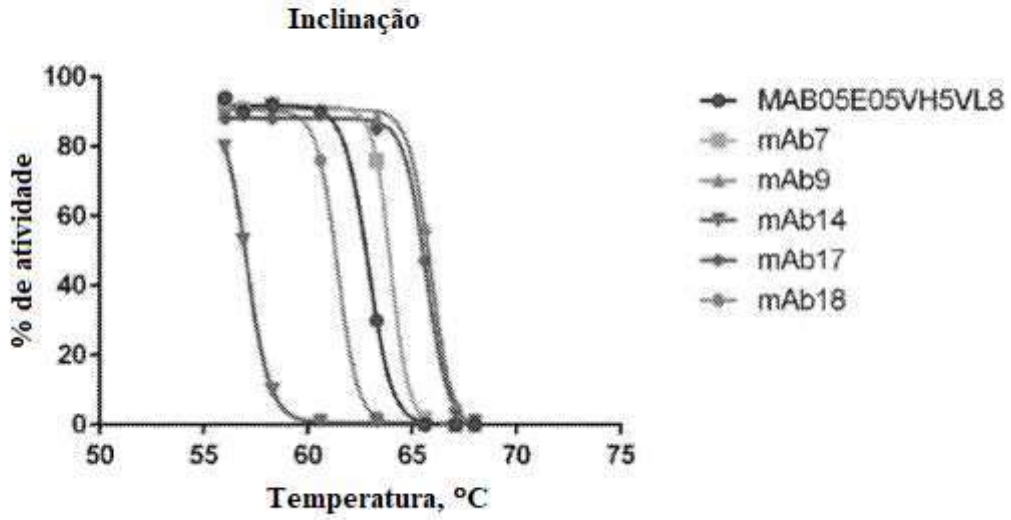


Figura 5B

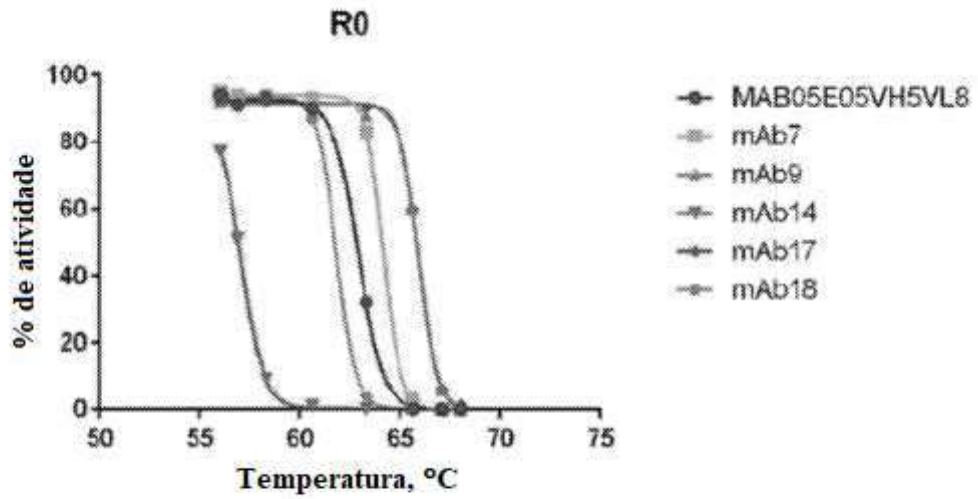
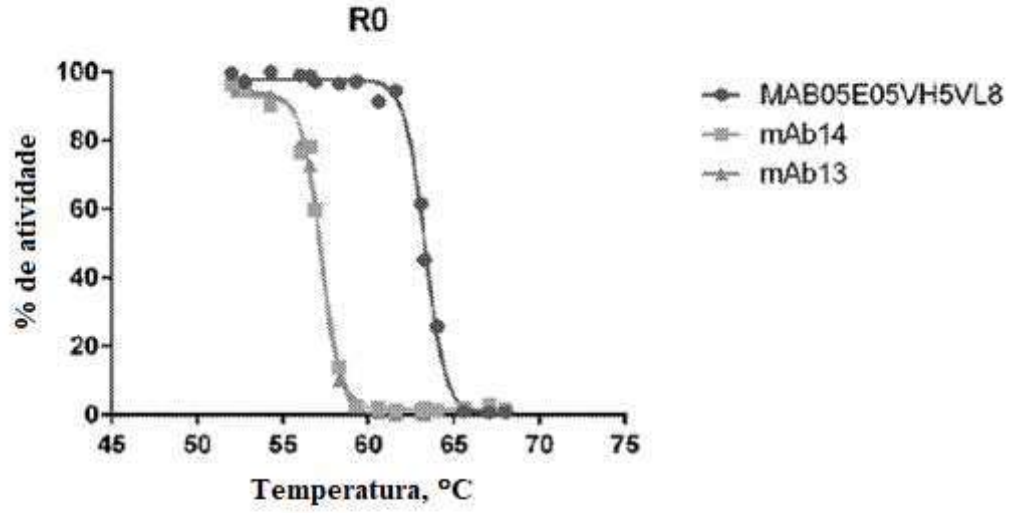


Figura 5C


R0
% de atividade
100
80
60
40
20
0
45
50
55
60
65
70
75
Temperatura, °C
MAB05E05VH5VL8
mAb14
mAb13

RESUMO

ANTICORPOS ANTI-APOC3 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

A presente divulgação provê anticorpos que se ligam especificamente a ApoC3 (*por exemplo*, ApoC3 humano) e antagonizam a função de ApoC3. Também são providas composições farmacêuticas compreendendo esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para a preparação desses anticorpos, e métodos de tratamento de um indivíduo usando esses anticorpos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202000471 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 29/04/2020
- Hora de Geração do Código: 10:39:39
- Código de Controle:
  - Campo 1: ABFC88506F57AD81
  - Campo 2: B742E9961D8C69A6