

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-504287

(P2022-504287A)

(43)公表日 令和4年1月13日(2022.1.13)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	Z N A 4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全76頁) 最終頁に続く		

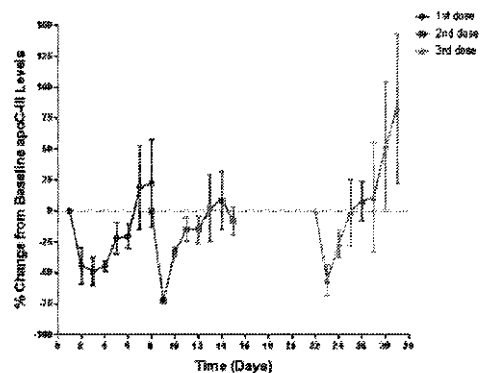
(21)出願番号	特願2021-518646(P2021-518646)	(71)出願人	519005473
(86)(22)出願日	令和1年10月3日(2019.10.3)		スターテン・バイオテクノロジー・ベー
(85)翻訳文提出日	令和3年5月17日(2021.5.17)		・フェー
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/058403		オランダ・6 5 3 4・アーテ・ネイメ
(87)国際公開番号	WO2020/070678		ーヘン・トランシストルウェフ・5 イエ
(87)国際公開日	令和2年4月9日(2020.4.9)		ー
(31)優先権主張番号	62/740,798	(74)代理人	100108453
(32)優先日	平成30年10月3日(2018.10.3)		弁理士 村山 靖彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100110364
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		弁理士 実広 信哉
		(74)代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		(72)発明者	ポール・ダシルヴァー・ジャーディン
			アメリカ合衆国・コネチカット・0 6 4
			3 7・ギルフォード・サム・ヒル・ロー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト及びカニクイザルA P O C 3 に特異的な抗体、並びにその使用の方法

(57)【要約】

本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合し、ApoC3機能に拮抗する抗体を提供する。これらの抗体を含む医薬組成物、これらの抗体をコードする核酸、これらの抗体を作製するための発現ベクター及び宿主細胞、並びにこれらの抗体を使用して対象を治療する方法も提供される。

FIG. 5A



【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、アミノ酸配列FSEFWDLDP(配列番号3)内のエピトープに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項2】

アミノ酸配列LSGFWDLNP(配列番号4)内のエピトープに特異的に結合する、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項3】

配列番号3の位置2、5、又は6におけるアミノ酸の少なくとも1つに特異的に結合する、請求項1に記載の単離された抗体。

10

【請求項4】

(a) 配列番号3の位置2及び5;

(b) 配列番号3の位置2及び6;

(c) 配列番号3の位置5及び6;又は

(d) 配列番号3の位置2、5、及び6

におけるアミノ酸に特異的に結合する、請求項1に記載の単離された抗体。

【請求項5】

相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、

20

(a) CDRH1は、アミノ酸配列TYSMR(配列番号5)を含み;

(b) CDRH2は、アミノ酸配列SISTDGGGTAYRDSVKG(配列番号6)を含み;

(c) CDRH3は、アミノ酸配列AGYSD(配列番号7)を含み;

(d) CDRL1は、アミノ酸配列X₁AX₂QX₃LX₄X₅X₆X₇GX₈TYLY(配列番号22)(式中、

X₁はK又はTであり、

X₂はG、S、又はTであり、

X₃はN又はSであり、

X₄はV又はRであり、

X₅はH又はYであり、

X₆はI、P、又はSであり、

30

X₇はD又はNであり、

X₈はK又はRである)

を含み;

(e) CDRL2は、アミノ酸配列X₁VSX₂RX₃S(配列番号23)(式中、

X₁はD又はGであり;

X₂はN又はTであり;

X₃はD、G、又はPである)

を含み;

(f) CDRL3は、アミノ酸配列AQX₁TYX₂X₃X₄T(配列番号24)(式中、

X₁はD又はGであり;

40

X₂はS、W、又はYであり;

X₃はP又はTであり;

X₄はK又はLである)

を含む、単離された抗体。

【請求項6】

(a) CDRL1が、配列番号8、9、10、11、12、及び13からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み;

(b) CDRL2が、配列番号14、15、16、17、及び18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み;

(c) CDRL3が、配列番号19、20、及び21からなる群より選択されるアミノ酸配列を含

50

む、請求項5に記載の単離された抗体。

【請求項7】

相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ配列番号5、6、7、8、14、及び19;5、6、7、9、15、及び19;5、6、7、10、14、及び19;5、6、7、11、16、及び20;5、6、7、12、17、及び21;5、6、7、13、15、及び19;又は5、6、7、10、18、及び20に記載されるアミノ酸配列を含む、単離された抗体。

【請求項8】

配列番号27～33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項9】

ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、配列番号27～33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体。

【請求項10】

ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号25及び27、25及び28、25及び29、25及び30、25及び31、25及び32、又は25及び33に記載されるアミノ酸配列を含む、単離された抗体。

【請求項11】

ヒトラムダ又はヒトカップパ軽鎖定常領域を含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項12】

配列番号50、51、52、53、54、55、又は56に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項11に記載の単離された抗体。

【請求項13】

重鎖定常領域を含み、任意でヒトIgG1、IgG2、又はIgG4定常領域を含む、請求項1から12のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項14】

定常領域が、野生型ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域のバリエーションであり、バリエーションヒト免疫グロブリン重鎖定常領域が、pH6でのヒト新生児Fc受容体(FcRn)に対する対応する野生型ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域のアフィニティーと比べて、pH6でのヒトFcRnに対する増加したアフィニティーを有する、請求項13に記載の単離された抗体。

【請求項15】

重鎖定常領域が、EU位置433、434、及び436にそれぞれアミノ酸K、F、及びYを含む、請求項13に記載の単離された抗体。

【請求項16】

重鎖定常領域が、EU位置252、254、及び256にそれぞれアミノ酸Y、T、及びEを含む、請求項13に記載の単離された抗体。

【請求項17】

重鎖定常領域が、EU位置428及び434にそれぞれアミノ酸L及びSを含む、請求項11に記載の単離された抗体。

【請求項18】

重鎖定常領域が、EU位置228にアミノ酸Pを含むIgG4定常領域である、請求項13から17のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項19】

配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の単離された抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号34及び50、35及び50、36及び50、37及び50、38及び50、39及び50、40及び50、41及び50、42及び50、43及び50、44及び50、45及び50、46及び50、47及び50、48及び50、又は49及び50に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体。

【請求項 21】

脂質に結合しているApoC3に結合し得る、請求項1から20のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 22】

超低密度リポタンパク質(VLDL)の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を弱める、請求項1から21のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 23】

対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を増加させ得る、請求項1から22のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 24】

対象における血中のApoC3のレベルを低下させ得る、請求項1から23のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 25】

対象における食後脂肪血症を阻害し得る、請求項1から24のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 26】

請求項1から25のいずれか一項に記載の抗体及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 27】

請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体の重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 28】

請求項27に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 29】

請求項28に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 30】

ApoC3に結合する抗体を産生するための方法であって、抗体の発現を可能にする条件下で請求項29に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 31】

対象の血中におけるApoC3の活性を阻害するための方法であって、請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 32】

対象の血中におけるトリグリセリドレベルを低下させるための方法であって、請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 33】

対象における食後脂肪血症を阻害するための方法であって、請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 34】

対象における高トリグリセリド血症を治療するための方法であって、請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 35】

対象におけるカイロミクロン血症を治療するための方法であって、請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

高トリグリセリド血症を有する対象における心血管疾患の危険性を低下させるための方法であって、請求項1から26のいずれか一項に記載の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項 37】

心血管疾患が心筋梗塞である、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

心血管疾患が狭心症である、請求項36に記載の方法。

【請求項 39】

心血管疾患が脳卒中である、請求項36に記載の方法。

10

【請求項 40】

心血管疾患がアテローム性動脈硬化である、請求項36に記載の方法。

【請求項 41】

抗体が、対象の血中におけるカイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを低下させる、請求項30から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

対象が追加の脂質降下剤を受けている、請求項30から40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

追加の脂質降下剤がHMG-CoAレダクターゼ阻害剤である、請求項42に記載の方法。

20

【請求項 44】

HMG-CoAレダクターゼ阻害剤が、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、又はシンバスタチンである、請求項43に記載の方法。

【請求項 45】

追加の脂質降下剤がPCSK9阻害剤である、請求項42に記載の方法。

【請求項 46】

PCSK9阻害剤が、アリロクマブ、エボロクマブ、又はボコシズマブである、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

追加の脂質降下剤がエゼチミブである、請求項42に記載の方法。

30

【請求項 48】

追加の脂質降下剤が、エゼチミブ及びHMG-CoAレダクターゼ阻害剤の組み合わせである、請求項42に記載の方法。

【請求項 49】

追加の脂質降下剤が、エゼチミブ、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、及びPCSK9阻害剤の組み合わせである、請求項42に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

40

本出願は、参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、2018年10月3日に出版された米国仮出願第62/740,798号の利益を主張する。

【0002】

本開示は、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する抗体、並びにそれを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

上昇した血中トリグリセリドレベル(高トリグリセリド血症)は、アテローム性動脈硬化の原因因子であり、心血管系死亡、狭心症、心筋梗塞、及び脳卒中等の心血管系事象の危険性を増加させる。

50

【0004】

ApoC3は、血中を非常に高い濃度(10 μ Mを上回る)で循環し、大部分はトリグリセリドリッチリポタンパク質(TRL)、TRL残留物、及び高比重リポタンパク質に結合しているタンパク質である。ApoC3は、血中トリグリセリドレベルの重要な調節因子であるように思われる。例えば、ヒトにおけるApoC3レベルは、血中トリグリセリドレベルと正に相関することが示されており、上昇したApoC3レベルは高トリグリセリド血症と関連する。加えて、ApoC3は、リポタンパク質リパーゼ(TRL中のトリグリセリドを加水分解する酵素)の活性を阻害すること、及びTRL残留物の肝取り込みも阻害することが示されており、その両方とも血中トリグリセリドレベルの上昇を引き起こす。

【0005】

フィブラート、ナイアシン、及びオメガ3脂肪酸等、いくつかの療法は、高トリグリセリド血症の治療に認可されている。しかしながら、これらの療法は、血漿トリグリセリドを下げることに於いて多少有効なだけである。従って、当技術分野において血漿トリグリセリドを下げるための向上した療法の必要性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】 米国特許第7,709,226号

【特許文献2】 W002/060919号

【特許文献3】 W098/23289号

【特許文献4】 W097/34631号

【特許文献5】 米国特許第5,869,046号

【特許文献6】 米国特許第6,121,022号

【特許文献7】 米国特許第6,277,375号

【特許文献8】 米国特許第6,165,745号

【特許文献9】 米国特許第8,088,376号

【特許文献10】 米国特許第8,163,881号

【特許文献11】 米国特許第7,658,921号

【特許文献12】 米国特許第4,044,126号

【特許文献13】 米国特許第4,414,209号

【特許文献14】 米国特許第4,364,923号

【特許文献15】 米国特許第6,267,983号

【特許文献16】 米国特許第6,261,595号

【特許文献17】 米国特許第6,256,533号

【特許文献18】 米国特許第6,167,301号

【特許文献19】 米国特許第6,024,975号

【特許文献20】 米国特許第6,010,715号

【特許文献21】 米国特許第5,985,317号

【特許文献22】 米国特許第5,983,134号

【特許文献23】 米国特許第5,948,433号

【特許文献24】 米国特許第5,860,957号

【特許文献25】 米国特許第6,316,652号

【特許文献26】 米国特許第6,274,552号

【特許文献27】 米国特許第6,271,359号

【特許文献28】 米国特許第6,253,872号

【特許文献29】 米国特許第6,139,865号

【特許文献30】 米国特許第6,131,570号

【特許文献31】 米国特許第6,120,751号

【特許文献32】 米国特許第6,071,495号

【特許文献33】 米国特許第6,060,082号

10

20

30

40

50

【特許文献 3 4】	米国特許第 6,048,736 号	
【特許文献 3 5】	米国特許第 6,039,975 号	
【特許文献 3 6】	米国特許第 6,004,534 号	
【特許文献 3 7】	米国特許第 5,985,307 号	
【特許文献 3 8】	米国特許第 5,972,366 号	
【特許文献 3 9】	米国特許第 5,900,252 号	
【特許文献 4 0】	米国特許第 5,840,674 号	
【特許文献 4 1】	米国特許第 5,759,542 号	
【特許文献 4 2】	米国特許第 5,709,874 号	
【特許文献 4 3】	米国特許第 5,965,726 号	10
【特許文献 4 4】	米国特許第 6,174,666 号	
【特許文献 4 5】	米国特許第 6,291,664 号	
【特許文献 4 6】	米国特許第 6,414,132 号	
【特許文献 4 7】	米国特許第 6,794,498 号	
【特許文献 4 8】	米国特許出願公報第 US 2005/0048549 号	
【特許文献 4 9】	WO86/05807 号	
【特許文献 5 0】	WO89/01036 号	
【特許文献 5 1】	米国特許第 5,122,464 号	
【特許文献 5 2】	米国特許第 5,807,715 号	
【特許文献 5 3】	PCT 出願第 PCT/GB91/001134 号	20
【特許文献 5 4】	WO90/02809 号	
【特許文献 5 5】	WO91/10737 号	
【特許文献 5 6】	WO92/01047 号	
【特許文献 5 7】	WO92/18619 号	
【特許文献 5 8】	WO93/11236 号	
【特許文献 5 9】	WO95/15982 号	
【特許文献 6 0】	WO95/20401 号	
【特許文献 6 1】	WO97/13844 号	
【特許文献 6 2】	米国特許第 5,698,426 号	
【特許文献 6 3】	米国特許第 5,223,409 号	30
【特許文献 6 4】	米国特許第 5,403,484 号	
【特許文献 6 5】	米国特許第 5,580,717 号	
【特許文献 6 6】	米国特許第 5,427,908 号	
【特許文献 6 7】	米国特許第 5,750,753 号	
【特許文献 6 8】	米国特許第 5,821,047 号	
【特許文献 6 9】	米国特許第 5,571,698 号	
【特許文献 7 0】	米国特許第 5,427,908 号	
【特許文献 7 1】	米国特許第 5,516,637 号	
【特許文献 7 2】	米国特許第 5,780,225 号	
【特許文献 7 3】	米国特許第 5,658,727 号	40
【特許文献 7 4】	米国特許第 5,733,743 号	
【特許文献 7 5】	米国特許第 5,969,108 号	
【特許文献 7 6】	WO92/22324 号	
【特許文献 7 7】	米国特許第 4,816,567 号	
【特許文献 7 8】	米国特許第 4,816,397 号	
【特許文献 7 9】	米国特許第 6,331,415 号	
【特許文献 8 0】	欧州特許第 EP 239400 号	
【特許文献 8 1】	WO91/09967 号	
【特許文献 8 2】	米国特許第 5,225,539 号	
【特許文献 8 3】	米国特許第 5,530,101 号	50

- 【特許文献 84】 米国特許第 5,585,089 号
- 【特許文献 85】 欧州特許第 EP 592106 号
- 【特許文献 86】 欧州特許第 EP 519596 号
- 【特許文献 87】 米国特許第 5,565,332 号
- 【特許文献 88】 米国特許第 6,407,213 号
- 【特許文献 89】 米国特許第 5,766,886 号
- 【特許文献 90】 W093/17105 号
- 【特許文献 91】 米国出願公報第 US 2005/0042664 号 A1
- 【特許文献 92】 米国特許第 7,951,917 号
- 【特許文献 93】 米国特許第 7,183,076 号 10
- 【特許文献 94】 米国特許第 8,227,577 号
- 【特許文献 95】 米国特許第 5,837,242 号
- 【特許文献 96】 米国特許第 5,989,830 号
- 【特許文献 97】 米国特許第 5,869,620 号
- 【特許文献 98】 米国特許第 6,132,992 号
- 【特許文献 99】 米国特許第 8,586,713 号
- 【特許文献 100】 米国特許第 6,005,079 号
- 【特許文献 101】 W094/04678 号
- 【特許文献 102】 W094/25591 号
- 【特許文献 103】 W001/44301 号 20
- 【特許文献 104】 W098/24893 号
- 【特許文献 105】 W096/34096 号
- 【特許文献 106】 W096/33735 号
- 【特許文献 107】 米国特許第 5,413,923 号
- 【特許文献 108】 米国特許第 5,625,126 号
- 【特許文献 109】 米国特許第 5,633,425 号
- 【特許文献 110】 米国特許第 5,569,825 号
- 【特許文献 111】 米国特許第 5,661,016 号
- 【特許文献 112】 米国特許第 5,545,806 号
- 【特許文献 113】 米国特許第 5,814,318 号 30
- 【特許文献 114】 米国特許第 5,939,598 号
- 【特許文献 115】 米国特許第 6,075,181 号
- 【特許文献 116】 米国特許第 6,150,184 号
- 【特許文献 117】 米国特許第 4,444,887 号
- 【特許文献 118】 米国特許第 4,716,111 号
- 【特許文献 119】 米国特許第 5,885,793 号
- 【特許文献 120】 W098/46645 号
- 【特許文献 121】 W098/50433 号
- 【特許文献 122】 W098/16654 号
- 【特許文献 123】 W091/10741 号 40
- 【特許文献 124】 W0/2018/007999 号
- 【特許文献 125】 PCT/IB2018/052780
- 【非特許文献】
- 【0007】
- 【非特許文献 1】 Kabat ら、J. Biol. Chem. 252、6609～6616 頁(1977)
- 【非特許文献 2】 Kabat ら、Sequences of protein of immunological interest. (1991)
- 【非特許文献 3】 Chothia ら、J. Mol. Biol. 196:901～917 頁(1987)
- 【非特許文献 4】 MacCallum ら、J. Mol. Biol. 262:732～745 頁(1996)
- 【非特許文献 5】 Edelman, G.M. ら、Proc. Natl. Acad. USA、63、78～85 頁(19 50

69)

- 【非特許文献6】Kabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、アメリカ合衆国保健福祉省、第5編、1991
- 【非特許文献7】Chothia C & Lesk AM、(1987)、J Mol Biol 196:901～917頁
- 【非特許文献8】Al-Lazikani Bら、(1997)J Mol Biol 273:927～948頁
- 【非特許文献9】Chothia Cら、(1992)J Mol Biol 227:799～817頁
- 【非特許文献10】Tramontano Aら、(1990)J Mol Biol 215(1):175～82頁
- 【非特許文献11】Lefranc M-P、(1999)The Immunologist 7:132～136頁
- 【非特許文献12】Lefranc M-Pら、(1999)Nucleic Acids Res 27:209～212頁
- 【非特許文献13】Martin A.「Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains」、Antibody Engineering、Kontermann及びDubel編、第31章、422～439頁、Springer-Verlag、Berlin(2001) 10
- 【非特許文献14】Dall'Acqua WFら、(2006)J Biol Chem 281:23514～24頁
- 【非特許文献15】Wardら、Mol. Immunol.(2015)67(200):131～41頁
- 【非特許文献16】Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co.、Easton、PA
- 【非特許文献17】Kutmeier Gら、(1994)、BioTechniques 17:242～6頁
- 【非特許文献18】Ausubel FMら、編、(1989)Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、Green Publishing Associates, Inc.及びJohn Wiley & Sons, Inc.、New York、6.3.1～6.3.6頁及び2.10.3頁 20
- 【非特許文献19】Foecking MK & Hofstetter H(1986)Gene 45:101～5頁
- 【非特許文献20】Cockett Mら、(1990)Biotechnology 8(7):662～7頁
- 【非特許文献21】Ruether U & Mueller-Hill B(1983)EMBO J 2:1791～1794頁
- 【非特許文献22】Inouye S & Inouye M(1985)Nuc Acids Res 13:3101～3109頁
- 【非特許文献23】Van Heeke G & Schuster SM(1989)J Biol Chem 24:5503～5509頁
- 【非特許文献24】Logan J & Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655～9頁
- 【非特許文献25】Bitter Gら、(1987)Methods Enzymol. 153:516～544頁
- 【非特許文献26】Wigler Mら、(1977)Cell 11(1):223～32頁
- 【非特許文献27】Szybalska EH & Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026～2034頁 30
- 【非特許文献28】Lowy Iら、(1980)Cell 22(3):817～23頁
- 【非特許文献29】Wigler Mら、(1980)PNAS 77(6):3567～70頁
- 【非特許文献30】O'Hare Kら、(1981)PNAS 78:1527～31頁
- 【非特許文献31】Mulligan RC & Berg P(1981)PNAS 78(4):2072～6頁
- 【非特許文献32】Wu GY & Wu CH(1991)Biotherapy 3:87～95頁
- 【非特許文献33】Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573～596頁
- 【非特許文献34】Mulligan RC(1993)Science 260:926～932頁
- 【非特許文献35】Morgan RA & Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191～217頁 40
- 【非特許文献36】Nabel GJ & Felgner PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211～5頁
- 【非特許文献37】Santerre RFら、(1984)Gene 30(1-3):147～56頁
- 【非特許文献38】Ausubel FMら、(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY(1993)
- 【非特許文献39】Kriegler M、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY(1990)
- 【非特許文献40】第12章及び第13章、Dracopoli NCら、(編)、Current Protocols in Human Genetics、John Wiley & Sons、NY(1994) 50

- 【非特許文献 4 1】 Colbere-Garapin Fら、(1981)J Mol Biol 150:1～14頁
- 【非特許文献 4 2】 Bebbington CR & Hentschel CCG、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning、第3巻(Academic Press、New York、1987)
- 【非特許文献 4 3】 Crouse GFら、(1983)Mol Cell Biol 3:257～66頁
- 【非特許文献 4 4】 Proudfoot NJ(1986)Nature 322:562～565頁
- 【非特許文献 4 5】 Kohler G(1980)PNAS 77:2197～2199頁
- 【非特許文献 4 6】 Maniatis Tら、(1982)Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 【非特許文献 4 7】 Sambrook Jら、(1989)、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第2編、Cold Spring Harbor Laboratory Press 10
- 【非特許文献 4 8】 Sambrook Jら、(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY
- 【非特許文献 4 9】 Ausubel FMら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons(1987年及び年次更新)
- 【非特許文献 5 0】 Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons(1987年及び年次更新)
- 【非特許文献 5 1】 Gait(編)(1984)Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach、IRL Press
- 【非特許文献 5 2】 Eckstein(編)(1991)Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach、IRL Press 20
- 【非特許文献 5 3】 Birren Bら、(編)(1999)Genome Analysis:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 【非特許文献 5 4】 Short Protocols in Molecular Biologyにおける第11章、(2002)、第5編、Ausubel FMら、編、John Wiley and Sons、New York
- 【非特許文献 5 5】 Harlow E & Lane D、Antibodies:A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2編、1988)
- 【非特許文献 5 6】 Hammerling GJら:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681(Elsevier、N.Y.、1981)
- 【非特許文献 5 7】 Kohler G & Milstein C(1975)Nature 256:495頁 30
- 【非特許文献 5 8】 Goding JW(編)、Monoclonal Antibodies:Principles and Practice、59～103頁(Academic Press、1986)
- 【非特許文献 5 9】 Kilpatrick KEら、(1997)Hybridoma 16:381～9頁
- 【非特許文献 6 0】 Kozbor D(1984)J Immunol 133:3001～5頁
- 【非特許文献 6 1】 Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51～63頁(Marcel Dekker, Inc.、New York、1987)
- 【非特許文献 6 2】 Brinkman Uら、(1995)J Immunol Methods 182:41～50頁
- 【非特許文献 6 3】 Ames RSら、(1995)J Immunol Methods 184:177～186頁
- 【非特許文献 6 4】 Kettleborough CAら、(1994)Eur J Immunol 24:952～958頁
- 【非特許文献 6 5】 Persic Lら、(1997)Gene 187:9～18頁 40
- 【非特許文献 6 6】 Burton DR & Barbas CF(1994)Advan Immunol 57:191～280頁
- 【非特許文献 6 7】 Mullinax RLら、(1992)BioTechniques 12(6):864～9頁
- 【非特許文献 6 8】 Sawai Hら、(1995)Am J Reprod Immunol 34:26～34頁
- 【非特許文献 6 9】 Better Mら、(1988)Science 240:1041～1043頁
- 【非特許文献 7 0】 Morrison SL(1985)Science 229:1202～7頁
- 【非特許文献 7 1】 Oi VT & Morrison SL(1986)BioTechniques 4:214～221頁
- 【非特許文献 7 2】 Gillies SDら、(1989)J Immunol Methods 125:191～202頁
- 【非特許文献 7 3】 Padlan EA(1991)Mol Immunol 28(4/5):489～498頁
- 【非特許文献 7 4】 Studnicka GMら、(1994)Prot Engineering 7(6):805～814頁 50

- 【非特許文献 75】 Roguska MAら、(1994)PNAS 91:969～973頁
 【非特許文献 76】 Tan Pら、(2002)J Immunol 169:1119～25頁
 【非特許文献 77】 Caldas Cら、(2000)Protein Eng. 13(5):353～60頁
 【非特許文献 78】 Morea Vら、(2000)Methods 20(3):267～79頁
 【非特許文献 79】 Baca Mら、(1997)J Biol Chem 272(16):10678～84頁
 【非特許文献 80】 Roguska MAら、(1996)Protein Eng 9(10):895 904
 【非特許文献 81】 Couto JRら、(1995)Cancer Res. 55(23補足):5973s～5977s頁
 【非特許文献 82】 Couto JRら、(1995)Cancer Res 55(8):1717～22頁
 【非特許文献 83】 Sandhu JS(1994)Gene 150(2):409～10頁
 【非特許文献 84】 Pedersen JTら、(1994)J Mol Biol 235(3):959～73頁
 【非特許文献 85】 Riechmann L & Muyldermans S(1999)J Immunol 231:25～38頁

10

- 【非特許文献 86】 Nuttall SDら、(2000)Curr Pharm Biotechnol 1(3):253～263頁
 【非特許文献 87】 Muyldermans S,(2001)J Biotechnol 74(4):277～302頁
 【非特許文献 88】 Greenspan NS & Bona CA(1989)FASEB J 7(5):437～444頁
 【非特許文献 89】 Nissinoff A(1991)J Immunol 147(8):2429～2438頁
 【非特許文献 90】 Lonberg N & Huszar D(1995)Int Rev Immunol 13:65～93頁
 【非特許文献 91】 Shinmoto Hら、(2004)Cytotechnology 46:19～23頁
 【非特許文献 92】 Naganawa Yら、(2005)Human Antibodies 14:27～31頁

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合し、ApoC3機能を阻害する抗体を提供する。これらの抗体を含む医薬組成物、これらの抗体をコードする核酸、これらの抗体を作製するための発現ベクター及び宿主細胞、並びにこれらの抗体を使用して対象を治療する方法も提供される。本明細書において開示される抗体は、ヒト及びカニクイザルApoC3に結合し得、それらが、肝細胞によるTRL取り込みを阻害するApoC3の能力を弱め得、ヒト又はカニクイザル対象に投与された場合にApoC3の血清レベルの急速で持続的な減少を引き起こし得るという点において特に有利である。従って、開示される抗ApoC3抗体は、高トリグリセリド血症及び関連疾患(例えば、心血管疾患及び膵炎)の治療及び阻止に有用である。

30

【0009】

従って、1つの態様において、本開示は、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体はアミノ酸配列FSEFWDLDP(配列番号3)内のエピトープに特異的に結合する、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、アミノ酸配列LSGFWDLNP(配列番号4)内のエピトープに特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号3の位置2、5、又は6におけるアミノ酸の少なくとも1つに特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、(a)配列番号3の位置2及び5;(b)配列番号3の位置2及び6;(c)配列番号3の位置5及び6;又は(d)配列番号3の位置2、5、及び6、におけるアミノ酸に特異的に結合する。

40

【0010】

別の態様において、本開示は、相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、
 (a)CDRH1は、アミノ酸配列TYSMR(配列番号5)を含み;
 (b)CDRH2は、アミノ酸配列SISTDGGGTAYRDSVKG(配列番号6)を含み;
 (c)CDRH3は、アミノ酸配列AGYSD(配列番号7)を含み;
 (d)CDRL1は、アミノ酸配列X1AX2QX3LX4X5X6X7GX8TYLY(配列番号22)(式中、X1はK又はTであり、

50

X2はG、S、又はTであり、
X3はN又はSであり、
X4はV又はRであり、
X5はH又はYであり、
X6はI、P、又はSであり、
X7はD又はNであり、
X8はK又はRである)

を含み;

(e)CDRL2は、アミノ酸配列X1VSX2RX3S(配列番号23)(式中、

X1はD又はGであり;

X2はN又はTであり;

X3はD、G、又はPである)

を含み;

(f)CDRL3は、アミノ酸配列AQX1TYX2X3X4T(配列番号24)(式中、

X1はD又はGであり;

X2はS、W、又はYであり;

X3はP又はTであり;

X4はK又はLである)

を含む、単離された抗体を提供する。

【0011】

ある特定の実施形態において、(a)CDRL1は、配列番号8、9、10、11、12、及び13からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み;(b)CDRL2は、配列番号14、15、16、17、及び18からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み;且つ/又は(c)CDRL3は、配列番号19、20、及び21からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

別の態様において、本開示は、相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を含む重鎖可変領域、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、それぞれ配列番号5、6、7、8、14、及び19;5、6、7、9、15、及び19;5、6、7、10、14、及び19;5、6、7、11、16、及び20;5、6、7、12、17、及び21;5、6、7、13、15、及び19;又は5、6、7、10、18、及び20に記載されるアミノ酸配列を含む、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号27~33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0013】

別の態様において、本開示は、ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、配列番号27~33からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗体を提供する。

【0014】

別の態様において、本開示は、ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号25及び27、25及び28、25及び29、25及び30、25及び31、25及び32、又は25及び33に記載されるアミノ酸配列を含む、単離された抗体を提供する。

【0015】

ある特定の実施形態において、抗体は、ヒトラムダ又はヒトカップ軽鎖定常領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号50、51、52、53、54、55、又は56に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0016】

ある特定の実施形態において、抗体は、重鎖定常領域を含み、任意でヒトIgG1、IgG2、又はIgG4定常領域を含む。ある特定の実施形態において、定常領域は、野生型ヒト免

10

20

30

40

50

疫グロブリン重鎖定常領域のバリエーションであり、バリエーションヒト免疫グロブリン重鎖定常領域は、pH6でのヒト新生児Fc受容体(FcRn)に対する対応する野生型ヒト免疫グロブリン重鎖定常領域のアフィニティーと比べて、pH6でのヒトFcRnに対する増加したアフィニティーを有する。

【0017】

ある特定の実施形態において、重鎖定常領域は、EU位置433、434、及び436にそれぞれアミノ酸K、F、及びYを含む。ある特定の実施形態において、重鎖定常領域は、EU位置252、254、及び256にそれぞれアミノ酸Y、T、及びEを含む。ある特定の実施形態において、重鎖定常領域は、EU位置428及び434にそれぞれアミノ酸L及びSを含む。ある特定の実施形態において、重鎖定常領域は、EU位置228にアミノ酸Pを含むIgG4定常領域である。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

10

【0018】

別の態様において、本開示は、ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号34及び50、35及び50、36及び50、37及び50、38及び50、39及び50、40及び50、41及び50、42及び50、43及び50、44及び50、45及び50、46及び50、47及び50、48及び50、又は49及び50に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

20

【0019】

ある特定の実施形態において、抗体は、脂質に結合しているApoC3に結合し得る。ある特定の実施形態において、抗体は、超低密度リポタンパク質(VLDL)の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を弱める。ある特定の実施形態において、抗体は、対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を増加させ得る。ある特定の実施形態において、抗体は、対象における血中のApoC3のレベルを低下させ得る。ある特定の実施形態において、抗体は、対象における食後脂肪血症を阻害し得る。

【0020】

別の態様において、本開示は、本明細書において開示される抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

30

【0021】

別の態様において、本開示は、本明細書において開示される抗体の重鎖可変領域及び/又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。別の態様において、本開示は、本明細書において開示されるポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。別の態様において、本開示は、本明細書において開示される発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0022】

別の態様において、本開示は、ApoC3に結合する抗体を産生するための方法であって、方法は、抗体の発現を可能にする条件下で本明細書において開示される宿主細胞を培養する工程を含む、方法を提供する。

40

【0023】

別の態様において、本開示は、対象の血中におけるApoC3の活性を阻害するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

【0024】

別の態様において、本開示は、対象の血中におけるトリグリセリドレベルを低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。別の態様において、本開示は、対象における食後脂肪血症を阻害するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。別の態様にお

50

いて、本開示は、対象における高トリグリセリド血症を治療するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。別の態様において、本開示は、対象におけるカイロミクロン血症を治療するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

【0025】

別の態様において、本開示は、高トリグリセリド血症を有する対象における心血管疾患の危険性を低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。ある特定の実施形態において、心血管疾患は心筋梗塞である。ある特定の実施形態において、心血管疾患は狭心症である。ある特定の実施形態において、心血管疾患は脳卒中である。ある特定の実施形態において、心血管疾患はアテローム性動脈硬化である。

10

【0026】

治療方法に関する前述の態様のある特定の実施形態において、抗体は、対象の血中におけるカイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを低下させる。ある特定の実施形態において、対象は追加の脂質降下剤を受けている。ある特定の実施形態において、追加の脂質降下剤はHMG-CoAレダクターゼ阻害剤である。ある特定の実施形態において、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤は、アトルバスタチン、フルバスタチン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、又はシンバスタチンである。ある特定の実施形態において、追加の脂質降下剤はPCSK9阻害剤である。ある特定の実施形態において、PCSK9阻害剤は、アリロクマブ、エボロクマブ、又はボコシズマブである。ある特定の実施形態において、追加の脂質降下剤はエゼチミブである。ある特定の実施形態において、追加の脂質降下剤は、エゼチミブ及びHMG-CoAレダクターゼ阻害剤の組み合わせである。ある特定の実施形態において、追加の脂質降下剤は、エゼチミブ、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、及びPCSK9阻害剤の組み合わせである。

20

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A】Hyhel5対照抗体、生殖細胞系列前(pre-germline)のpH依存性5E5VH5_VL8抗体、及び29A06試験抗体で処理されたAAV8-huApoC3マウスモデルにおける、ヒトApoC3のレベルを示したグラフである。図1Aは、抗体投与後のヒトApoC3レベルの変化パーセントを示している。

30

【図1B】Hyhel5対照抗体、生殖細胞系列前のpH依存性5E5VH5_VL8抗体、及び29A06試験抗体で処理されたAAV8-huApoC3マウスモデルにおける、ヒトApoC3のレベルを示したグラフである。図1Bは、マウス血漿におけるヒトApoC3レベル(μM)を示している。

【図2】Hyhel5対照抗体、生殖細胞系列前のpH依存性5E5VH5_VL8抗体、及び29A06試験抗体で処理されたAAV8-huApoC3マウスモデルにおける、マウスApoC3レベルの変化パーセントを示したグラフである。

【図3A】Hyhel5対照抗体、生殖細胞系列前のpH依存性5E5VH5_VL8抗体、及び29A06試験抗体で処理されたAAV8-huApoC3マウスモデルにおける、血漿トリグリセリドレベルを示したグラフである。図3Aは、抗体投与後のトリグリセリドレベルの変化パーセントを示している。

40

【図3B】Hyhel5対照抗体、生殖細胞系列前のpH依存性5E5VH5_VL8抗体、及び29A06試験抗体で処理されたAAV8-huApoC3マウスモデルにおける、血漿トリグリセリドレベルを示したグラフである。図3Bは、マウス血漿におけるトリグリセリドレベル(mg/dL)を示している。

【図4】Hyhel5対照抗体、生殖細胞系列前のpH依存性5E5VH5_VL8抗体、及び29A06試験抗体で処理されたAAV8-huApoC3マウスモデルにおける、IgGのレベル($\mu\text{g/mL}$)を示したグラフである。

【図5A】29A06-NHance抗体の3回の投薬で処理されたカニクイザルにおける、Apo

50

C3のレベルを示したグラフである。図5Aは、抗体投与後のカニクイザルApoC3レベルの変化パーセントを示している。

【図5B】29A06-NHance抗体の3回の投薬で処理されたカニクイザルにおける、ApoC3のレベルを示したグラフである。図5Bは、血漿におけるカニクイザルApoC3レベル(μM)を示している。

【図6】29A06-NHance抗体の3回の投薬で処理された動物における、カニクイザルApoBレベル(mg/dL)を示したグラフである。

【図7A】29A06-NHance抗体の3回の投薬で処理されたカニクイザルにおける、血清トリグリセリドのレベルを示したグラフである。図7Aは、抗体投与後のトリグリセリドレベルの変化パーセントを示している。

【図7B】29A06-NHance抗体の3回の投薬で処理されたカニクイザルにおける、血清トリグリセリドのレベルを示したグラフである。図7Bは、カニクイザル血清におけるトリグリセリドレベル(mg/dL)を示している。

【図8】29A06-NHance抗体の3回の投薬で処理されたカニクイザルにおける、IgGのレベル($\mu\text{g/mL}$)を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0028】

詳細な説明

本開示は、ヒト及びカニクイザルApoC3に特異的に結合し、ApoC3機能を阻害する抗体を提供する。これらの抗体を含む医薬組成物、これらの抗体をコードする核酸、これらの抗体を作製するための発現ベクター及び宿主細胞、並びにこれらの抗体を使用して対象を治療する方法も提供される。本明細書において開示される抗体は、ヒト及びカニクイザルApoC3に結合し得、それらが、肝細胞によるTRL取り込みを阻害するApoC3の能力を弱め得、ヒト又はカニクイザル対象に投与された場合にApoC3の血清レベルの急速で持続的な減少を引き起こし得るという点において特に有利である。従って、開示される抗ApoC3抗体は、高トリグリセリド血症及び関連疾患(例えば、心血管疾患及び膵炎)の治療及び阻止に有用である。

【0029】

1. 定義

本明細書において使用するとき、「ApoC3」という用語は、アポリポタンパク質C3タンパク質を指す。ある特定の実施形態において、ApoC3はヒトApoC3である。例示的なヒトApoC3アミノ酸配列は、RefSeqアクセッション番号NP_000031.1に記載されている。NP_000031.1の成熟アミノ酸配列は、以下のとおりである。

SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFSSLKDYWS
TVKDKFSEFWDLDPVVRPTSAVAA(配列番号1)

【0030】

ある特定の実施形態において、ApoC3はカニクイザルApoC3である。例示的なカニクイザルApoC3アミノ酸配列は、RefSeqアクセッション番号XP_005579787.1に記載されている。XP_005579787.1の成熟アミノ酸配列は、以下のとおりである。

MQPRVLLVAALLSLLASARASEAEDTSLGFMQGYMQHATKTAKDALTSVQESQVA
QQARGWVTDGFSSLKDYWS TVKDKLSGFWDLNPEAKPTLAEAA(配列番号2)

【0031】

本明細書において使用するとき、「抗体(antibody)」及び「抗体(antibodies)」という用語は、全長抗体、全長抗体の抗原結合フラグメント、及び抗体CDR、VH領域、又はVL領域を含む分子を含む。抗体の例には、モノクローナル抗体、組み換えで産生された抗体、単一特異性抗体、多特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2本の重鎖及び2本の軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-抗体重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、単ドメイン抗体、一価抗体、一本鎖抗体又は一本鎖Fv(scFv)、scFv-Fc、ラクダ科抗体(例えば、ラマ抗体)、ラクダ

10

20

30

40

50

化抗体、アフィボディ(affybody)、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、抗・抗Id抗体を含む)、並びに上記のいずれかの抗原結合フラグメントが含まれる。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体は、ポリクローナル抗体集団を指す。抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY)、任意のクラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、又はIgA₂)、又は任意のサブクラス(例えば、IgG_{2a}又はIgG_{2b})のものであり得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体は、IgG抗体、又はそのクラス(例えば、ヒトIgG₁又はIgG₄)若しくはサブクラスである。具体的な実施形態において、抗体はヒト化モノクローナル抗体である。

10

【0032】

本明細書において使用するとき、「単離された抗体」という用語は、同定されており、その天然環境の少なくとも1つの成分から分離されており、且つ/又は回収されている抗体を指す。「単離された抗体」という用語は、組み換え宿主細胞内のインサイチュウでの抗体を含む。

【0033】

本明細書において使用するとき、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見い出される非連続の抗原結合部位を意味する。これらの特定の領域は、そのすべてが参照によりそれらの全体として組み入れられる、Kabatら、J. Biol. Chem. 252、6609～6616頁(1977)及びKabatら、Sequences of protein of immunological interest.(1991)によって、Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901～917頁(1987)によって、並びにMacCallumら、J. Mol. Biol. 262:732～745頁(1996)によって記載されており、定義は、互いに対して比較した場合にアミノ酸残基の重複又は部分集合を含む。ある特定の実施形態において、「CDR」という用語は、Kabatら、J. Biol. Chem. 252、6609～6616頁(1977)及びKabatら、Sequences of protein of immunological interest.(1991)によって定義されるCDRである。CDRH1、CDRH2、及びCDRH3は重鎖CDRを表し、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は軽鎖CDRを表す。

20

【0034】

本明細書において使用するとき、「フレームワーク(FR)アミノ酸残基」という用語は、免疫グロブリン鎖のフレームワーク領域におけるそれらのアミノ酸を指す。本明細書において使用される「フレームワーク領域」又は「FR領域」という用語は、可変領域の一部であるがCDRの一部ではないアミノ酸残基を含む(例えば、CDRのKabat定義を使用して)。

30

【0035】

本明細書において使用するとき、「可変領域」及び「可変ドメイン」という用語は互換可能に使用され、当技術分野においてよく見られる。可変領域は、抗体の一部分、一般的には軽鎖又は重鎖の一部分、典型的には成熟重鎖におけるアミノ末端約110～120個のアミノ酸又は110～125個のアミノ酸、及び成熟軽鎖における約90～115個のアミノ酸を典型的に指し、それは、抗体間で配列が大幅に異なり、特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性において使用される。配列の可変性は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれるそうした領域に集中し、一方で可変ドメインにおけるより高度に保存された領域はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。いかなる特定のメカニズム又は理論によっても拘束されることを望むことなく、軽鎖及び重鎖のCDRは、抗体と抗原との相互作用及び特異性に主として関与すると考えられる。ある特定の実施形態において、可変領域はヒト可変領域である。ある特定の実施形態において、可変領域は、齧歯類又はマウスCDR、及びヒトフレームワーク領域(FR)を含む。特定の実施形態において、可変領域は霊長類(例えば、非ヒト霊長類)可変領域である。ある特定の実施形態において、可変領域は、齧歯類又はマウスCDR、及び霊長類(例えば、非ヒト霊長類)フレームワーク領域(FR)を含む。

40

【0036】

50

「VL」及び「VLドメイン」という用語は、抗体の軽鎖可変領域を指すために互換可能に使用される。

【0037】

「VH」及び「VHドメイン」という用語は、抗体の重鎖可変領域を指すために互換可能に使用される。

【0038】

本明細書において使用するとき、「定常領域」及び「定常ドメイン」という用語は互換可能であり、当技術分野においてよく見られる。定常領域は、抗体の抗原への結合に直接関わらないが、Fc受容体との相互作用等の様々なエフェクター機能を呈し得る抗体部分、例えば軽鎖又は重鎖のカルボキシル末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は、一般的に、免疫グロブリン可変ドメインと比べてより保存されたアミノ酸配列を有する。

【0039】

本明細書において使用するとき、「重鎖」という用語は、抗体に関して使用される場合、定常ドメインのアミノ酸配列に基づく任意の個別のタイプ、例えばアルファ(α)、デルタ(δ)、エプシロン(ϵ)、ガンマ(γ)、及びミュー(μ)を指し得、それは、IgGのサブクラス、例えばIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含めた、抗体のIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMクラスをそれぞれ生じさせる。

【0040】

本明細書において使用するとき、「軽鎖」という用語は、抗体に関して使用される場合、定常ドメインのアミノ酸配列に基づく任意の個別のタイプ、例えばカッパ(κ)又はラムダ(λ)を指し得る。軽鎖アミノ酸配列は、当技術分野において周知である。具体的な実施形態において、軽鎖はヒト軽鎖である。

【0041】

本明細書において使用するとき、「EU位置」という用語は、そのそれぞれが参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、Edelman, G.M.ら、Proc. Natl. Acad. USA、63、78～85頁(1969)及びKabatら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、アメリカ合衆国保健福祉省、第5編、1991に記載される、抗体の定常領域に関するEU番号付け慣習に従ったアミノ酸位置を指す。

【0042】

本明細書において使用するとき、「に特異的に結合する」という用語は、約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、若しくはそれ未満の解離定数(K_D)で抗原に結合する、又は非特異的抗原に対するそのアフィニティーよりも少なくとも2倍大きいアフィニティーで抗原に結合する抗体の能力を指す。

【0043】

本明細書において使用するとき、「エピトープ」とは、抗体が特異的に結合し得る、抗原の限局的領域を指す。エピトープは、例えばポリペプチドの連続アミノ酸であり得る(直鎖状又は連続エピトープ)、又はエピトープは、例えば1つ若しくは複数のポリペプチドの2つ以上の非連続領域から形成され得る(立体構造的、非直鎖状、不連続的、非連続エピトープ)。ある特定の実施形態において、抗体が結合するエピトープは、例えばNMR分光法、X線回析結晶学調査、ELISAアッセイ、質量分析と連動した水素/重水素交換(例えば、液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー質量分析)、ペプチドスキャンアッセイ、又は変異誘発マッピング(例えば、部位指向性変異誘発マッピング)によって決定される。

【0044】

本明細書において使用するとき、「治療する」、「治療すること」、及び「治療」という用語は、本明細書において開示される治療的又は阻止的手段を指す。「治療」の方法は、疾患若しくは障害を有する又はそのような疾患若しくは障害を有する傾向がある対象への抗ApoC3抗体の投与を採用して、疾患若しくは障害又は再発性疾患若しくは障害を阻止する、治癒する、遅らせる、その重症度を低下させる、発症する危険性を低下させる、又

10

20

30

40

50

はその1つ若しくは複数の症状を改善する、或いはそのような治療の非存在下で予想されるものを超えて対象の生存期間を延長させる。

【0045】

本明細書において使用するとき、対象への療法の投与の文脈における「有効量」という用語は、所望の予防効果又は治療効果を実現する、療法の量を指す。

【0046】

本明細書において使用するとき、「対象」という用語は、任意のヒト又は非ヒト動物(例えば、カニクイザル)を含む。

【0047】

本明細書において使用するとき、「又は」という用語は、及び/又はを意味する。

10

【0048】

本明細書において使用するとき、「約」及び「およそ」という用語は、数値又は数値域を修飾するために使用される場合、値又は値域を5%～10%上回る及び5%～10%下回る逸脱が、列挙された値又は値域の意図される意味の範囲内にとどまることを示す。

【0049】

2. 抗ApoC3抗体

1つの態様において、本開示は、ヒト及びカニクイザル(マカカ・ファシキュラリス(*Macaca fascicularis*))ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、ヒトApoC3アミノ酸配列FSEFWDLDP(配列番号3)内のエピトープに特異的に結合する、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号3の位置2、5、又は6におけるアミノ酸の少なくとも1つに特異的に結合する。例えば、ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号3の位置2及び5に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号3の位置2及び6に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号3の位置5及び6に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号3の位置2、5、及び6に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号4の位置2、5、又は6におけるアミノ酸の少なくとも1つに特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、カニクイザルアミノ酸配列LSGFWDLP(配列番号4)内のエピトープにも特異的に結合する。例えば、ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号4の位置2及び5に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号4の位置2及び6に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号4の位置5及び6に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号4の位置2、5、及び6に特異的に結合する。

20

30

【0050】

例示的な抗ApoC3抗体のアミノ酸配列は、本明細書におけるTable 1(表1)～Table 5(表5)に記載されている。

【0051】

【表1】

表1.例示的な抗ApoC3抗体の重鎖CDRアミノ酸配列

クローン	CDRH1	配列番号	CDRH2	配列番号	CDRH3	配列番号
5E5	TYSMR	5	SISTDGGGTAYRDSVKG	6	AGYSD	7

40

【0052】

50

【表 2】

表2.例示的な抗ApoC3抗体の軽鎖CDRアミノ酸配列

クローン	CDRL1	配列 番号	CDRL2	配列 番号	CDRL3	配列 番号
29B03	KAGQNLVHPDGKTYLY	8	QVSNRDS	14	AQGTYPWPKT	19
29A06	KASQNLVHSNGKTYLY	9	QVSNRGS	15	AQGTYPWPKT	19
29A05	KASQSLVYSDGKTYLY	10	QVSNRDS	14	AQGTYPWPKT	19
29G02	KATQSLVHIDGKTYLY	11	QVSTRDS	16	AQDTYSTKT	20
30D10	TASQSLRHSDGRTYLY	12	RVSTRDP	17	AQGTYYPLT	21
29F10	KASQSLVHPDGKTYLY	13	QVSNRGS	15	AQGTYPWPKT	19
29G11	KASQSLVYSDGKTYLY	10	QVSNRPS	18	AQDTYSTKT	20

10

【 0 0 5 3 】

20

30

40

50

【表 3】

表3.軽鎖CDRコンセンサスアミノ酸配列

CDR	アミノ酸配列	配列 番号
CDRL1 コンセン サス	X ₁ AX ₂ QX ₃ LX ₄ X ₅ X ₆ X ₇ GX ₈ TYLY、式中: X ₁ はK又はTであり; X ₂ はG、S又はTであり; X ₃ はN又はSであり; X ₄ はV又はRであり; X ₅ はH又はYであり; X ₆ はI、P、又はSであり; X ₇ はD又はNであり; X ₈ はK又はRである。	22
CDRL2 コンセン サス	X ₁ VSX ₂ RX ₃ S、式中: X ₁ はD又はGであり; X ₂ はN又はTであり; X ₃ はD、G又はPである。	23
CDRL3 コンセン サス	AQX ₁ TYX ₂ X ₃ X ₄ T、式中: X ₁ はD又はGであり; X ₂ はS、W又はYであり; X ₃ はP又はTであり; X ₄ はK又はLである。	24

【 0 0 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 4】

表4.例示的な抗ApoC3抗体のVH及びVLアミノ酸配列

VH/VL	アミノ酸配列	配列 番号
5E5 VH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	25
5E5 VL	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPG QSPQQLIQVSNRASGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVYY CAQGTYYPHFTGSGTRLEIK	26
29B03 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCKAGQNLVHPDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIQVSNRDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKVEDAGVY YCAQGTYWPKTFGQGTKLEIK	27
29A06 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCKASQNLVHSNGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIQVSNRGSEVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVY YCAQGTYWPKTFGQGTKLEIK	28
29A05 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCKASQSLVYSDGKTYLYWLLQKPG QSPQRLIQVSNRDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKVEDAGVYY CAQGTYWPKTFGQGTKLEIK	29
29G02 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCKATQSLVHIDGKTYLYWLLQKPG QSPQRLIQVSTRDSGVDPDRFTGAGSGAEFTLKISGVKAEDAGVYY CAQDTYSTKTFGQGTKLEIK	30
30D10 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGESASISCTASQSLRHSDGRTYLYWLRQKPG QSPQRLIKRVSTRDPGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVRAEDAGVYY CAQGTYYPLTFGQGTKVELK	31
29F10 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGEPASVSCASQSLVHPDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIQVSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLEISGVKAEDAGVY YCAQGTYWPKTFGQGTKLEIK	32
29G11 VL	DVVLTTQTPGSLSVVPGGSASISCKASQSLVYSDGKTYLYWLRQKP GQSPQRLIQVSNRPSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVY YCAQDTYSTKTFGQGTKLEIK	33

10

20

30

【 0 0 5 5 】

40

50

【表 5 A】

表5.例示的な抗ApoC3抗体の完全な重鎖及び軽鎖配列

抗体鎖	アミノ酸配列	配列番号
29A06 IgG1 重鎖	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	34
29A06 IgG1 重鎖 (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	35
29A06 IgG1 重鎖 YTE	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	36
29A06 IgG1 重鎖 YTE(マイ ナス C 末 端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	37

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 5 B】

抗体鎖	アミノ酸配列	配列番号
29A06 IgG1 重鎖 Nhance	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPGK	38
29A06 IgG1 重鎖 Nhance (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPG	39
29A06 IgG1 重鎖 Xtend	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALH <u>S</u> HYTQKSLSLSPGK	40
29A06 IgG1 重鎖 Xtend (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALH <u>S</u> HYTQKSLSLSPG	41

10

20

30

40

【 0 0 5 7 】

50

【表 5 C】

抗体鎖	アミノ酸配列	配列番号
29A06 IgG4 S228P 重鎖	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	42
29A06 IgG4 S228P 重鎖 (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	43
29A06 IgG4 S228P 重鎖 YTE	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	44
29A06 IgG4 S228P 重鎖 YTE (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	45

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 5 D】

抗体鎖	アミノ酸配列	配列番号
29A06 IgG4 S228P 重鎖 Nhance	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSLGK	46
29A06 IgG4 S228P 重鎖 Nhance (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSLG	47
29A06 IgG4 S228P 重鎖 Xtend	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVL <u>H</u> HEALH <u>S</u> HYTQKSLSLSLGK	48
29A06 IgG4 S228P 重鎖 Xtend (マイナス C 末端 K)	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRKA LEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNNLKPE DTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVL <u>H</u> HEALH <u>S</u> HYTQKSLSLSLG	49

10

20

30

40

【 0 0 5 9 】

50

【表 5 E】

抗体鎖	アミノ酸配列	配列番号
29A06 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGESASISCKASQNLVHSNGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIYQVSNRGSEVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVY YCAQGTYPKTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	50
29B03 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGESASISCKAGQNLVHPDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIYQVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKVEDAGV YYCAQGTYPKTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	51
29A05 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGESASISCKASQSLVYSDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIYQVSNRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKVEDAGV YYCAQGTYPKTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	52
29G02 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGESASISCKATQSLVHIDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIYQVSTRDSGVPDRFTGAGSGAEFTLKISGVKAEDAGV YYCAQDTYSTKTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	53
30D10 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGESASISCTASQSLRHS DGR TYLYWLRQKP GQSPQRLIKRVSTRDPGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVRAEDAGVY YCAQGTYYPLTFGQGTKVELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	54
29F10 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGEPASVSCASQSLVHPDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIYQVSNRSGVPDRFTGSGSGTDFTLEISGVKAEDAGVY YCAQGTYPKTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	55
29G11 カッパ軽鎖	DVVLVTQTPGSLSVVPGGSASISCKASQSLVYSDGKTYLYWLRQKP GQSPQRLIYQVSNRPSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGVY YCAQDTYSTKTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	56

10

20

30

40

【0060】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、本明細書におけるTable 4(表4)に記載されるVHドメインのCDRの1つ、2つ、又は3つすべてを含むVHドメインを含む、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVHドメインのCDRH1を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVHドメインのCDRH2を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVHドメインのCDRH3を含む。

【0061】

50

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、本明細書におけるTable 4(表4)に開示されるVLドメインのCDRの1つ、2つ、又は3つすべてを含むVLドメインを含む、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVLドメインのうちの1つのCDRL1を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVLドメインのうちの1つのCDRL2を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVLドメインのうちの1つのCDRL3を含む。

【0062】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を有する重鎖可変領域、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を有する軽鎖可変領域を含み、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3は、Table 1(表1)～Table 4(表4)に記載される抗体のそれぞれCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域のアミノ酸配列を含む、単離された抗体を提供する。

【0063】

ある特定の実施形態において、抗体のCDRは、Kabatら、J. Biol. Chem. 252、6609～6616頁(1977)及びKabatら、Sequences of protein of immunological interest(1991)に従って決定され得る。ある特定の実施形態において、抗体の軽鎖CDRはKabatに従って決定され、抗体の重鎖CDRはMacCallum(上記)に従って決定される。

【0064】

ある特定の実施形態において、抗体のCDRは、免疫グロブリン構造ループの場所を指すChothia番号付けスキームに従って決定され得る(例えば、Chothia C & Lesk AM、(1987)、J Mol Biol 196:901～917頁;Al-Lazikani Bら、(1997)J Mol Biol 273:927～948頁;Chothia Cら、(1992)J Mol Biol 227:799～817頁;Tramontano Aら、(1990)J Mol Biol 215(1):175～82頁;及び米国特許第7,709,226号を参照されたい)。典型的に、Kabat番号付け慣習を使用する場合、Chothia CDRH1ループは重鎖アミノ酸26～32、33、又は34に存在し、Chothia CDRH2ループは重鎖アミノ酸52～56に存在し、Chothia CDRH3ループは重鎖アミノ酸95～102に存在し、一方でChothia CDRL1ループは軽鎖アミノ酸24～34に存在し、Chothia CDRL2ループは軽鎖アミノ酸50～56に存在し、Chothia CDRL3ループは軽鎖アミノ酸89～97に存在する。Chothia CDRH1ループの末端は、Kabat番号付け慣習を使用して番号付けされる場合、ループの長さに応じてH32～H34の間で異なる(この理由は、Kabat番号付けスキームはH35A及びH35Bに挿入を置くためであり;35Aも35Bも存在しない場合、ループは32で終わり;35Aのみが存在する場合、ループは33で終わり;35A及び35Bの両方が存在する場合、ループは34で終わる)。

【0065】

ある特定の実施形態において、抗体のCDRは、Lefranc M-P、(1999)The Immunologist 7:132～136頁及びLefranc M-Pら、(1999)Nucleic Acids Res 27:209～212頁に記載されるIMGT番号付けシステムに従って決定され得る。IMGT番号付けスキームに従うと、CDRH1は位置26～35にあり、CDRH2は位置51～57にあり、CDRH3は位置93～102にあり、CDRL1は位置27～32にあり、CDRL2は50～52にあり、CDRL3は位置89～97にある。

【0066】

ある特定の実施形態において、抗体のCDRは、Kabat CDRとChothia構造ループとの間の折衷案であり、Oxford Molecular社のAbM抗体モデリングソフトウェア(Oxford Molecular Group社)によって使用される、AbM超可変領域を指すAbM番号付けスキームに従って決定され得る。

【0067】

ある特定の実施形態において、抗体のCDRは、MacCallum RMら、(1996) J Mol Biol 262:732~745頁に従って決定され得る。例えば、Martin A.「Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains」、Antibody Engineering、Kontermann及びDubel編、第31章、422~439頁、Springer-Verlag、Berlin(2001)も参照されたい。

【0068】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、Table 4(表4)に記載されるVHドメインのCDRH1、CDRH2、及びCDRH3領域アミノ酸配列を含む重鎖可変領域、並びにTable 2(表2)に記載されるVLドメインのCDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、各CDRは、本明細書において開示される、CDRのKabat、Chothia、IMGT、MacCallum、又はAbM定義に従って独立して定義される、単離された抗体を提供する。

10

【0069】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、相補性決定領域CDRH1、CDRH2、及びCDRH3を有する重鎖可変領域、並びに相補性決定領域CDRL1、CDRL2、及びCDRL3を有する軽鎖可変領域を含み、

(a)CDRH1は、TYSMR(配列番号5)のアミノ酸配列を含み;

(b)CDRH2は、SISTDGGGTAYRDSVKG(配列番号6)のアミノ酸配列を含み;

(c)CDRH3は、AGYSD(配列番号7)のアミノ酸配列を含み;

(d)CDRL1は、X₁AX₂QX₃LX₄X₅X₆X₇GX₈TYLYのアミノ酸配列、式中、X₁はK又はTであり;X₂はG、S、又はTであり;X₃はN又はSであり;X₄はV又はRであり;X₅はH又はYであり;X₆はI、P、又はSであり;X₇はD又はNであり;X₈はK又はRである(配列番号22)を含み;

(e)CDRL2は、X₁VSX₂RX₃Sのアミノ酸配列、式中、

X₁はD又はGであり;X₂はN又はTであり;X₃はD、G、又はPである(配列番号23)を含み;

(f)CDRL3は、AQX₁TYX₂X₃X₄Tのアミノ酸配列、式中、

X₁はD又はGであり;X₂はS、W、又はYであり;X₃はP又はTであり;X₄はK又はLである(配列番号24)を含む、単離された抗体を提供する。

20

30

【0070】

ある特定の実施形態において、CDRL1は、KAGQNLVHPDGKTYLY(配列番号8)、KASQNLVHSNGKTYLY(配列番号9)、KASQSLVYSDGKTYLY(配列番号10)、KATQSLVHIDGKTYLY(配列番号11)、TASQSLRHS DGRTYLY(配列番号12)、又はKASQSLVHPDGKTYLY(配列番号13)のアミノ酸配列を含む。

【0071】

ある特定の実施形態において、CDRL2は、QVSNRDS(配列番号14)、QVSNRGS(配列番号15)、QVSTRDS(配列番号16)、RVSTRDP(配列番号17)、又はQVSNRPS(配列番号18)のアミノ酸配列を含む。

【0072】

ある特定の実施形態において、CDRL3は、AQGTYPKT(配列番号19)、AQDTYSTKT(配列番号20)、又はAQGTYPPLT(配列番号21)のアミノ酸配列を含む。

40

【0073】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、それぞれ配列番号5、6、及び7に記載されるCDRH1、CDRH2、及びCDRH3アミノ酸配列を含むVHドメインを含む、単離された抗体を提供する。

【0074】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、それぞれ配列番号8、14、及

50

び19;9、15、及び19;10、14、及び19;11、16、及び20;12、17、及び21;13、15、及び19;又は10、18、及び20に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含むVLドメインを含む、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号8、14、及び19に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号9、15、及び19に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号10、14、及び19に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号11、16、及び20に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号12、17、及び21に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号13、15、及び19に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、VLドメインは、それぞれ配列番号10、18、及び20に記載されるCDRL1、CDRL2、及びCDRL3アミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0075】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、CDRH1、CDRH2、及びCDRH3領域を含む重鎖可変領域、並びにCDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域を含む軽鎖可変領域を含み、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、8、14、及び19;5、6、7、9、15、及び19;5、6、7、10、14、及び19;5、6、7、11、16、及び20;5、6、7、12、17、及び21;5、6、7、13、15、及び19;又は5、6、7、10、18、及び20に記載されるアミノ酸配列を含む、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、8、14、及び19に記載されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、9、15、及び19に記載されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、10、14、及び19に記載されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、11、16、及び20に記載されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、12、17、及び21に記載されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、13、15、及び19に記載されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態において、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3領域は、それぞれ配列番号5、6、7、10、18、及び20に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0076】

ある特定の実施形態において、本開示は、配列番号25に記載されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は100%(例えば、少なくとも86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%)同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号25に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0077】

ある特定の実施形態において、本開示は、配列番号27、28、29、30、31、32、又は33に記載されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は100%(例えば、少なくとも86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、9

8、又は99%)同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号27、28、29、30、31、32、又は33に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号27に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号28に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号29に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号30に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号31に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号32に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号33に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0078】

ある特定の実施形態において、本開示は、配列番号25に記載されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は100%(例えば、少なくとも86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%)同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号27、28、29、30、31、32、又は33に記載されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は100%(例えば、少なくとも86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、又は99%)同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態において、抗体は、配列番号25に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号27、28、29、30、31、32、又は33に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び27、25及び28、25及び29、25及び30、25及び31、25及び32、又は25及び33に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び27に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び28に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び29に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び30に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び31に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び32に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号25及び33に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。

20

30

【0079】

任意のIg定常領域が、本明細書において開示される単離された抗体において使用され得る。ある特定の実施形態において、Ig定常領域は、ヒトIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、若しくはIgY免疫グロブリン(Ig)分子の定常領域、及び/又は免疫グロブリン分子の任意のクラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂)若しくは任意のサブクラス(例えば、IgG_{2a}及びIgG_{2b})の定常領域である。ある特定の実施形態において、Ig定常領域は、ヒト又はヒト化Ig定常領域である。

40

【0080】

ある特定の実施形態において、定常領域は、野生型ヒトIg(例えば、IgG)重鎖定常領域のバリエーションであり、バリエーションヒトIg重鎖定常領域は、同じ条件下でのヒト新生児Fc受容体(FcRn)に対する対応する野生型ヒトIg重鎖定常領域のアフィニティーと比べて、酸性pH(例えば、pH5.5~pH6)でのヒトFcRnに対する増加したアフィニティー(例えば、

50

少なくとも1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、又は20倍増加した)を有する。ある特定の実施形態において、バリエーションヒトIg重鎖定常領域は、同じ条件下でのヒト新生児Fc受容体(FcRn)に対する野生型ヒトIg重鎖定常領域のアフィニティーと比べて、生理学的pHでの(例えば、pH7.4での)ヒトFcRnに対する同程度の又は減少したアフィニティー(例えば、多くとも(no more than)1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、若しくは2倍、それと同等、又は減少した)を有する。ある特定の実施形態において、定常領域は、野生型Ig(例えば、IgG)定常ドメイン又はそのFcRn結合フラグメント(例えば、Fc又はヒンジ-Fcドメインフラグメント)由来の1つ、2つ、又はそれを上回る数のアミノ酸(例えば、1つ又は複数の置換、挿入、又は欠失を有する)を含む。ある特定の実施形態において、バリエーション定常領域を有する抗体のインビボでの半減期は、野生型定常ドメイン又はそのFcRn結合フラグメントを有する対応する抗体のインビボでの半減期と比べて増加する。例えば抗体のインビボでの半減期を増加させるであろう変異について、そのすべてが参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる、例えば国際公報W002/060919号;W098/23289号;及びW097/34631号;並びに米国特許第5,869,046号、第6,121,022号、第6,277,375号、第6,165,745号、第8,088,376号、及び第8,163,881号を参照されたい。ある特定の実施形態において、1つ又は複数の異なるアミノ酸は、EU番号付けシステムに従って番号付けされた、第2の定常(CH2)ドメイン(ヒトIgG₁の残基231~340)及び/又は第3の定常(CH3)ドメイン(ヒトIgG₁の残基341~447)にある。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体のIgG(例えば、IgG₁、IgG₂、又はIgG₄)の定常領域は、EU番号付けシステムに従って番号付けされた、位置252、254、及び256にそれぞれアミノ酸チロシン(Y)、トレオニン(T)、及びグルタミン酸(E)を含む。参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、米国特許第7,658,921号を参照されたい。「YTE IgG」と称されるこのタイプのIgGは、同じ抗体の野生型バージョンと比較して4倍増加した半減期を呈示することが示されている(参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、Dall'Acqua WFら、(2006)J Biol Chem 281:23514~24頁を参照されたい)。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体のIgG(例えば、IgG₁)の定常領域は、EU番号付けシステムに従って番号付けされた、位置434にアミノ酸アラニン(A)、セリン(S)、チロシン(Y)、又はフェニルアラニン(F)を含む。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体のIgG(例えば、IgG₁、IgG₂、又はIgG₄)の定常領域は、EU番号付けシステムに従って番号付けされた、位置433、434、及び436にそれぞれアミノ酸リジン(K)、フェニルアラニン(F)、及びチロシン(Y)を含む。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体のIgG(例えば、IgG₁、IgG₂、又はIgG₄)の定常領域は、EU番号付けシステムに従って番号付けされた、位置428及び434にそれぞれアミノ酸ロイシン(L)及びセリン(S)を含む。酸性条件下でFcRnに対する増加したアフィニティーを有し得る追加のIgG定常領域は、参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、Wardら、Mol. Immunol.(2015)67(200):131~41頁に記載されている。ある特定の実施形態において、抗体は、EU番号付けシステムに従って番号付けされた、位置251~257、285~290、308~314、385~389、及び428~436にアミノ酸残基の1つ、2つ、3つ、又はそれを上回る数のアミノ酸置換を含むIgG定常ドメインを含む。

【0081】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、単離された抗体を提供する。

【0082】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は、配列番号50、51、52、53、54、55、又は56に記載されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、単離された抗体を提供

する。

【0083】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号34及び50、35及び50、36及び50、37及び50、38及び50、39及び50、40及び50、41及び50、42及び50、43及び50、44及び50、45及び50、46及び50、47及び50、48及び50、又は49及び50に記載されるアミノ酸配列を含む、単離された抗体を提供する。

【0084】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号34及び50、35及び50、36及び50、37及び50、38及び50、39及び50、40及び50、41及び50、42及び50、43及び50、44及び50、45及び50、46及び50、47及び50、48及び50、又は49及び50に記載されるアミノ酸配列からなる、単離された抗体を提供する。

10

【0085】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり;軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号51に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

20

【0086】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり;軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号52に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

【0087】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり;軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号53に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

30

【0088】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり;軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号54に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

40

【0089】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり;軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号55に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

50

【0090】

ある特定の実施形態において、本開示は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する単離された抗体であって、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖のアミノ酸配列は、配列番号34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、又は49に記載されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり;軽鎖のアミノ酸配列は、配列番号56に記載されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、単離された抗体を提供する。

【0091】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、TRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を弱める(インビボで又はインビトロで)。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、TRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%弱める。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、TRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍弱める。

10

20

【0092】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、食事の前、間、又は後に対象に投与された場合、対象における食後脂肪血症を阻害し得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における食後脂肪血症を、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%阻害し得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における食後脂肪血症を、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍阻害し得る。

30

【0093】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、食事の前、間、又は後に対象に投与された場合、対象における食後カイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを低下させ得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における食後カイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%低下させ得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における食後カイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍低下させ得る。

40

【0094】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を増加させ得る。ある特定の実施形態にお

50

いて、抗ApoC3抗体は、対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加させ得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加させ得る。ApoC3のクリアランスを査定するための方法には、限定されることなく同位体トレーサー技法が含まれ、同位体は放射性又は安定性のいずれかであり得る。

10

【0095】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、対象における血中のApoC3のレベルを低下させ得る。ある特定の実施形態において、抗ApoC3抗体は、対象における血中のApoC3のレベルを、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%低下させ得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における血中のApoC3のレベルを、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍低下させ得る。ある特定の実施形態において、対象における血中のApoC3のレベルの低下は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、若しくは50日間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、若しくは8週間維持される。

20

【0096】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、脂質に結合しているApoC3(例えば、トリグリセリド、TRL(例えば、VLDL)、又はTRL残留物に結合しているApoC3)に結合し得る。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、脂質又はリポタンパク質へのApoC3の結合を阻害しない。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体は、ApoC3の結合を脂質又はリポタンパク質と競合しない。ある特定の実施形態において、脂質は脂肪酸鎖を含む。ある特定の実施形態において、脂質はホスファチジル基を含む。ある特定の実施形態において、脂質は、ホスファチジルコリン(例えば、DMPC)、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンシトール、又はホスファチジルグリセロールを含む。ある特定の実施形態において、脂質はトリグリセリドである。ある特定の実施形態において、脂質は、TRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物である。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体の存在下における脂質及びリポタンパク質(例えば、トリグリセリド、TRL(例えば、VLDL)、又はTRL残留物)に結合するApoC3の能力は、抗ApoC3抗体の非存在下における同じ脂質及びリポタンパク質に結合するApoC3の能力の、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%である。

30

40

【0097】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、TRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を弱める。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体の存在下における肝細胞(例えば、HepG2細胞)によるTRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物の取り込みは、抗ApoC3抗体の非存在下における肝細胞(例えば、HepG2細胞)によるTRL(例えば、

50

VLDL)又はTRL残留物の取り込みよりも、少なくとも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、又は5倍高い。

【0098】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される単離された抗体は、TRL(例えば、VLDL)又はTRL残留物の肝細胞取り込みを阻害するApoC3の能力を弱め、脂質に結合しているApoC3(例えば、トリグリセリド、TRL(例えば、VLDL)、又はTRL残留物に結合しているApoC3)に結合し得る。

【0099】

3.使用の方法

ApoC3は、肝細胞によるTRL(例えば、VLDL)及びTRL残留物の取り込み及びクリアランスを阻害し、TRL(例えば、VLDL)のリポタンパク質リパーゼ媒介性脂肪分解を阻害し、それによって、対象の血中におけるトリグリセリドレベルを増加させる機能を果たす。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、肝細胞によるTRL(例えば、VLDL)及びTRL残留物の取り込み及びクリアランスを阻害するApoC3の能力を弱め得る、又はTRL(例えば、VLDL)のリポタンパク質リパーゼ媒介性脂肪分解を阻害するApoC3の能力を弱め得る。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象の血中におけるApoC3の活性を阻害するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。ある特定の実施形態において、ApoC3の活性は、肝細胞によるTRL(例えば、VLDL)及びTRL残留物の取り込み及びクリアランスの阻害である。ある特定の実施形態において、ApoC3の活性は、TRLのリポタンパク質リパーゼ媒介性脂肪分解の阻害である。ある特定の実施形態において、ApoC3の活性は、肝細胞によるTRL(例えば、VLDL)及びTRL残留物の取り込み及びクリアランスの阻害、並びにTRLのリポタンパク質リパーゼ媒介性脂肪分解の阻害である。

【0100】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を増加させるのに有用である。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象における血液からのApoC3のクリアランスの速度を増加させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

【0101】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象の血中におけるApoC3のレベルを低下させるのに有用である。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象の血中におけるApoC3のレベルを低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。ある特定の実施形態において、方法は、対象の血中におけるApoC3のレベルを、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%低下させる。ある特定の実施形態において、方法は、対象における血中のApoC3のレベルを、本明細書において開示される方法によって又は当業者に公知の方法によって査定される少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍低下させる。ある特定の実施形態において、対象における血中のApoC3のレベルの低下は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、若しくは50日間、又は少なくとも1、2、3、4、5、6、7、若しくは8週間維持される。

【0102】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象の血中におけるトリグリセリドレベルを低下させるのに有用である。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象

の血中におけるトリグリセリドレベルを低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

【0103】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、高トリグリセリド血症の治療に有用である。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象における高トリグリセリド血症を治療するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、対象におけるカイロミクロン血症を治療するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。ある特定の実施形態において、本開示は、対象におけるカイロミクロン血症症候群を治療するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

10

【0104】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における食後脂肪血症の治療及び阻止に有用である。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象における食後脂肪血症を阻害するための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。抗ApoC3抗体は、食事の前、間、又は後に対象に投与され得る。

20

【0105】

理論によって拘束されることを望むことなく、本出願者らは、ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体は、食事の前、間、又は後に対象に投与された場合、対象における食後カイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを低下させ得ると考える。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、対象における食後カイロミクロン又はカイロミクロン残留物のレベルを低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。抗ApoC3抗体は、食事の前、間、又は後に対象に投与され得る。

【0106】

高トリグリセリド血症を有する患者における血中のトリグリセリドレベルの低下は、膵炎の発症の危険性を低下させ得る。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、高トリグリセリド血症を有する対象における膵炎の危険性を低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

30

【0107】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、対象における心血管疾患の危険性を低下させるのに有用である。従って、ある特定の実施形態において、本開示は、高トリグリセリド血症を有する対象における心血管疾患の危険性を低下させるための方法であって、方法は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。高トリグリセリド血症又は過度の食後脂肪血症と関連した又はそれによって引き起こされる任意の心血管疾患を発症する危険性は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の投与によって低下し得る。危険性が低下し得る心血管疾患には、限定されることなく、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化、狭心症、心筋梗塞、及び脳卒中が含まれる。

40

【0108】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物は、単独で又は追加の治療剤との組み合わせで投与され得る。ある特定の実施形態において、追加の治療剤は別の脂質降下剤である。任意の1つ又は複数の脂質降下剤が、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物との組み合わせで使用され得る。適切な脂質降下剤には、限定されることなく、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤(例えば、アトルバスタチン、フルバスタ

50

チン、ロバスタチン、ピタバスタチン、プラバスタチン、ロスバスタチン、又はシンバスタチン)、フィブラート、ナイアシン、胆汁酸封鎖剤(例えば、コレステラミン、コレステポール、及びコレセベラム)、食事性コレステロール吸収の阻害剤(例えば、エゼチミブ)、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質(MTP)阻害剤(例えば、ロミタピド)、フィステロール、隣リパーゼ阻害剤(例えば、オルリスタット)、コレステリルエステル転送タンパク質阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤(例えば、TAK-475、ザラゴジン酸、及びRPR 107393)、ApoA-1ミラノ、スクシノブコール(AGI-1067)、アポタンパク質B阻害剤(例えば、ミボメルセン)、及びプロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシントタイプ9(PCSK9)阻害剤(例えば、アリロクマブ、エボロクマブ、及びボコシズマブ)が含まれる。ある特定の実施形態において、追加の脂質降下剤は、エゼチミブ及びHMG-CoAレダクターゼ阻害剤の組み合わせである。ある特定の実施形態において、脂質降下剤は、エゼチミブ、HMG-CoAレダクターゼ阻害剤、及びPCSK9阻害剤の組み合わせである。

10

【0109】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物は、多様な経路によって対象に送達され得る。これらには、非経口、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下経路が含まれるが、それらに限定されるわけではない。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体又は医薬組成物は、皮下に又は静脈内に送達される。

【0110】

病状の治療又は阻止に有効であろう、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物の量は、疾患の性質に依存すると考えられ、標準的な臨床技法によって経験的に決定され得る。組成物において採用されるべき正確な用量は、投与の経路、及び感染症又はそれによって引き起こされる疾患の深刻度にも依存すると考えられ、実践者の判断及び各対象の状況に従って決められるべきである。例えば、有効用量は、患者がヒト又は動物であるかどうか、他の医薬が投薬されるかどうか、又は治療が予防的若しくは治療的であるかどうかにかかわらず、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態(年齢、体重、及び健康状態を含む)にも応じて変わり得る。本明細書において開示される抗ApoC3抗体又は医薬組成物は、任意の頻度で(例えば、ほぼ毎週、2週間ごとに、3週間ごとに、4週間ごとに、毎月、又は2ヶ月ごとに)投与され得る。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳類を含めた非ヒト哺乳類も治療され得る。治療投薬量及びレジメンを最適に調整して、安全性及び効力を最適化する。

20

30

【0111】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体を使用して、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、又はウェスタンブロッティング等のイムノアッセイを含めた、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して、生物学的サンプルにおけるApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)タンパク質レベルをアッセイもし得る。適切な抗体アッセイ標識は、当技術分野において公知であり、グルコースオキシダーゼ等の酵素標識;ヨウ素(125I、121I)、炭素(14C)、硫黄(35S)、トリチウム(3H)、インジウム(121In)、及びテクネチウム(99Tc)等の放射性同位体;ルミノール等の発光標識;並びにフルオレセイン及びローダミン等の蛍光標識、並びにビオチンを含む。そのような標識を使用して、本明細書において開示される抗体を標識し得る。或いは、本明細書において開示される抗ApoC3抗体を認識する二次抗体を標識し得、抗ApoC3抗体との組み合わせで使用してApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)タンパク質レベルを検出し得る。

40

【0112】

ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)タンパク質の発現レベルについてアッセイすることは、直接的に(例えば、絶対タンパク質レベルを判定する又は推定することによる)又は相対的に(例えば、第2の生物学的サンプルにおける疾患関連タンパク質レベルと比較することによる)のいずれかで、第1の生物学的サンプルにおけるApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)タンパク質のレベルを定性的に又は定量的に測定すること又は推定することを含むことを意図される。第1の生物学的サンプルにおけるApoC3(

50

例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)ポリペプチド発現レベルは、測定され得又は推定され得、基準ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)タンパク質レベルと比較され得、基準は、障害を有しない個体から獲得された第2の生物学的サンプルから選ばれる、又は障害を有しない個体の集団からのレベルを平均化することによって決定される。当技術分野において解されるであろうように、「基準」ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)ポリペプチドレベルが分かり次第、それは、比較のための基準として繰り返し使用され得る。

【0113】

本明細書において使用するとき、「生物学的サンプル」という用語は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)を潜在的に発現する対象、細胞株、組織、又は細胞の他の供給源から獲得された任意の生物学的サンプルを指す。動物(例えば、ヒト)から組織生検及び体液を獲得するための方法は、当技術分野において周知である。生物学的サンプルには、末梢単核血液細胞が含まれる。

10

【0114】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、当業者に周知で標準的な、本説明に基づくインビトロ及びインビボ適用を含めた、予後、診断、モニタリング、及びスクリーニング適用に使用され得る。免疫系状態又は免疫応答についてのインビトロ査定及び評価のための予後、診断、モニタリング、及びスクリーニングアッセイ及びキットを利用して、上昇したApoC3活性を有することが既知の又は有する疑いがある者を含めた患者サンプルを予測し、診断し、及びモニターして評価し得る。1つの実施形態において、抗ApoC3抗体は、生検サンプルの免疫組織化学において使用され得る。別の実施形態において、抗ApoC3抗体を使用して、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)のレベルを検出し得、次いでレベルをある特定の疾患症状に関連付けし得る。本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、検出可能な又は機能的な標識を担持し得る。蛍光標識が使用される場合、当技術分野において公知の、現時点で利用可能な顕微鏡法及び蛍光活性化セルソーター分析(FACS)、又は両方法手順の組み合わせを利用して、特異的結合メンバーを同定し得及び定量し得る。本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、蛍光標識を担持し得る。例示的な蛍光標識には、例えば反応性の及びコンジュゲートしたプローブ、例えばアミノクマリン、フルオレセイン、及びTexas red、Alexa Fluor色素、Cy色素、並びにDyLight色素が含まれる。抗ApoC3抗体は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{117}Lu 、 ^{121}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{198}Au 、 ^{211}At 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 、及び ^{186}Re 同位体等の放射性標識を担持し得る。放射性標識が使用される場合、当技術分野において公知の、現時点で利用可能な計数手順を利用して、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)への抗ApoC3抗体の特異的結合を同定し得及び定量し得る。標識が酵素である場合には、検出は、当技術分野において公知の、現在利用される比色性の、分光学的な、蛍光分光学的な、電流測定のもの、又は気体定量的な技法のいずれかによって達成され得る。これは、抗体とApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)との間の複合体の形成を可能にする条件下で、サンプル又は対照サンプルと抗ApoC3抗体とを接触させることによって実現され得る。抗体とApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)との間で形成された任意の複合体は、サンプル及び対照において検出され及び比較される。本明細書において開示される抗体を使用して、免疫アフィニティー精製によりApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)を精製もし得る。例えばApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)の存在の程度についての定量分析のための試験キットの形態で調製され得るアッセイシステムも本明細書に含まれる。システム又は試験キットは、標識された成分、例えば標識されたApoC3抗体、及び1つ又は複数の追加の免疫化学的試薬を含み得る。

20

30

40

【0115】

4. 医薬組成物

生理学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co., Easton, PA)中に、所望の程度の純度を有す

50

る本明細書において開示される抗ApoC3抗体を含む医薬組成物が本明細書において提供される。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、採用される投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、及び他の有機酸等のバッファー;アスコルビン酸及びメチオニンを含めた抗酸化物質;防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド;ヘキサメトニウムクロリド;ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド;フェノール、ブチル、又はベンジルアルコール;メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;及びm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン等のタンパク質;ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー;グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸;グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含めた、単糖、二糖、及び他の炭水化物;EDTA等のキレート剤;スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖類;ナトリウム等の塩形成対イオン;金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体);又はTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)、若しくはポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0116】

具体的な実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に、本明細書において開示される抗ApoC3抗体、及び任意で1つ又は複数の追加の予防用又は治療用作用物質を含む。具体的な実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体中に、本明細書において開示される抗体の有効量、及び任意で1つ又は複数の追加の予防用又は治療用作用物質を含む。一部の実施形態において、抗体は、医薬組成物に含まれる唯一の活性成分である。本明細書において開示される医薬組成物は、ApoC3活性を阻害することにおいて、及び癌又は感染性疾患等の病状を治療することにおいて有用であり得る。

20

【0117】

非経口調製物において使用される薬学的に許容される担体には、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗微生物剤、等張剤、バッファー、抗酸化物質、局部麻酔薬、懸濁化剤及び分散剤、乳化剤、封鎖剤又はキレート剤、並びに他の薬学的に許容される物質が含まれる。水性ビヒクルの例には、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張デキストロース注射液、滅菌水注射液、デキストロース及び乳酸リンゲル注射液が含まれる。非水性非経口ビヒクルには、植物起源の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油、及び落花生油が含まれる。フェノール類又はクレゾール類、水銀類、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチル及びプロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、ベンザルコニウムクロリド、並びにベンゼトニウムクロリドを含む、静菌又は静真菌濃度の抗微生物剤が、複数回用量容器にパッケージされた非経口調製物に添加され得る。等張剤には、塩化ナトリウム及びデキストロースが含まれる。バッファーには、ホスフェート及びシトレートが含まれる。抗酸化物質には硫酸水素ナトリウムが含まれる。局部麻酔薬にはプロカイン塩酸塩が含まれる。懸濁化剤及び分散剤には、カルボキシメチルセルロースナトリウム(sodium carboxymethylcellulose)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、及びポリビニルピロリドンが含まれる。乳化剤にはポリソルベート80(TWEEN(登録商標)80)が含まれる。金属イオンの封鎖剤又はキレート剤にはEDTAが含まれる。薬学的担体には、水混和性ビヒクル用のエチルアルコール、ポリエチレングリコール、及びプロピレングリコール;並びにpH調整用の水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸、又は乳酸も含まれる。

30

40

【0118】

医薬組成物は、対象への投与の任意の経路のために製剤化され得る。投与の経路の具体的な例には、鼻腔内、経口、肺内、経皮、皮内、及び非経口が含まれる。皮下、筋肉内、又は静脈内注射のいずれかによって特徴付けられる非経口投与も本明細書において企図される。注射物質は、液体溶液若しくは懸濁液のいずれかとしての従来の形態に、注射前の液体の状態の溶液若しくは懸濁液に適した固体形態に、又は乳濁液として調製され得る。注射物質、溶液、及び乳濁液は、1つ又は複数の賦形剤も含有する。適切な賦形剤は、例えば水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、又はエタノールである。加えて、所

50

望の場合、投与される対象となる医薬組成物は、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、安定剤、溶解度増強剤、並びに例えば酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミン、及びシクロデキストリン類等の他のそのような作用物質等、微量の非毒性補助物質も含有し得る。

【0119】

抗体の非経口投与のための調製物には、注射の準備ができている滅菌溶液、皮下注射用錠剤を含めた、使用直前に溶媒と組み合わせられる準備ができている凍結乾燥粉末等の無菌の乾燥した可溶性産物、注射の準備ができている滅菌懸濁液、使用直前にビヒクルと組み合わせられる準備ができている無菌の乾燥した不溶性産物、及び滅菌乳濁液が含まれる。溶液は、水性又は非水性のいずれかであり得る。

10

【0120】

静脈内投与される場合、適切な担体には、生理学的食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、並びにグルコース、ポリエチレングリコール、及びポリプロピレングリコール、並びにその混合物等の増粘剤及び可溶化剤を含有する溶液が含まれる。

【0121】

抗体を含む局所用混合物は、局部及び全身投与に関して記載されるように調製される。結果として生じる混合物は、溶液、懸濁液、乳濁液等であり得、クリーム、ゲル、軟膏、乳濁液、溶液、エリキシル剤、ローション、懸濁液、チンキ剤、ペースト、泡、エアロゾル、灌水、スプレー、座薬、包帯、皮膚パッチ、又は局所投与に適した他の任意の製剤として製剤化され得る。

20

【0122】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、吸入等による局所適用のためのエアロゾルとして製剤化され得る(例えば、炎症性疾患、特に喘息の治療に有用なステロイドの送達のためのエアロゾルを記載している、米国特許第4,044,126号、第4,414,209号、及び第4,364,923号を参照されたい)。気道への投与のためのこれらの製剤は、単独で又はラクトース等の不活性担体との組み合わせで、噴霧器用のエアロゾル若しくは溶液の形態にあり得る、又は通気用の超微粒粉末としてあり得る。そのような場合、製剤の粒子は、1つの実施形態では50ミクロン未満、1つの実施形態では10ミクロン未満の直径を有するであろう。

【0123】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体は、ゲル、クリーム、及びローションの形態での、眼内等の皮膚及び粘膜への局所適用のために、並びに眼への適用のために、又は嚢内若しくは髄腔内適用のために等、局部又は局所適用のために製剤化され得る。局所投与は、経皮送達に、及び眼若しくは粘膜への投与にも、又は吸入療法に企図される。単独での又は他の薬学的に許容される賦形剤との組み合わせでの、抗体の点鼻液も投与され得る。

30

【0124】

イオン泳動及び電気泳動デバイスを含めた経皮パッチは当業者に周知であり、それを使用して抗体を投与し得る。例えば、そのようなパッチは、米国特許第6,267,983号、第6,261,595号、第6,256,533号、第6,167,301号、第6,024,975号、第6,010,715号、第5,985,317号、第5,983,134号、第5,948,433号、及び第5,860,957号に開示されている。

40

【0125】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体を含む医薬組成物は凍結乾燥粉末であり、それは、溶液、乳濁液、及び他の混合物として投与のために再構成され得る。それは、固体又はゲルとしても再構成され得及び製剤化され得る。凍結乾燥粉末は、本明細書において開示される抗体又は薬学的に許容されるその誘導体を適切な溶媒に溶解することによって調製される。一部の実施形態において、凍結乾燥粉末は無菌である。溶媒は、粉末又は粉末から調製された再構成溶液の他の薬理学的成分の安定性を向上させる賦形剤を含有し得る。使用され得る賦形剤には、デキストロース、ソルビト

50

ール、フルクトース、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、スクロース、又は他の適切な作用物質が含まれるが、それらに限定されるわけではない。溶媒は、1つの実施形態ではほぼ中性のpHの、シトレート、リン酸ナトリウム若しくはカリウム等のバッファー、又は当業者に公知の他のそのようなバッファーも含有し得る。溶液の後続の滅菌濾過、それに続く当業者に公知の標準的条件下での凍結乾燥は、所望の製剤を提供する。1つの実施形態において、結果として生じた溶液は、凍結乾燥のためのバイアルに分配されるであろう。各バイアルは、化合物の単回投薬量又は複数回投薬量を含有するであろう。凍結乾燥粉末は、約4℃～室温等での適当な条件下で保管され得る。この凍結乾燥粉末の注射用水での再構成は、非経口投与における使用のための製剤を提供する。再構成のために、凍結乾燥粉末を滅菌水又は他の適切な担体に添加する。正確な量は、選択された化合物に依存する。そのような量は、経験的に決定され得る。

10

【0126】

本明細書において開示される抗ApoC3抗体及び本明細書において提供される他の組成物は、治療されるべき対象の身体の特定の組織、受容体、又は他のエリアに標的化されるようにも製剤化され得る。多くのそのような標的化法が当業者に周知である。すべてのそのような標的化法が、本組成物における使用のために本明細書において企図される。標的化法の非限定的な例に関しては、例えば米国特許第6,316,652号、第6,274,552号、第6,271,359号、第6,253,872号、第6,139,865号、第6,131,570号、第6,120,751号、第6,071,495号、第6,060,082号、第6,048,736号、第6,039,975号、第6,004,534号、第5,985,307号、第5,972,366号、第5,900,252号、第5,840,674号、

20

【0127】

インビボ投与に使用される対象となる組成物は無菌であり得る。これは、例えば滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

【0128】

5. ポリヌクレオチド、ベクター、及び抗ApoC3抗体を産生する方法

別の態様において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体(例えば、軽鎖可変領域又は重鎖可変領域)をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、及びベクター、例えば宿主細胞(例えば、大腸菌(*E. coli*)及び哺乳類細胞)における組み換え発現のためにそのようなポリヌクレオチドを含むベクターが本明細書において提供される。

30

【0129】

本明細書において使用するとき、「単離された」ポリヌクレオチド又は核酸分子は、核酸分子の天然供給源に(例えば、マウス又はヒトに)存在する他の核酸分子から分離されているものである。更には、cDNA分子等の「単離された」核酸分子は、組み換え技法によって産生される場合、他の細胞物質若しくは培養培地を実質的に不含であり得る、又は化学的に合成される場合、化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に不含であり得る。例えば、「実質的に不含である」という言葉は、約15%、10%、5%、2%、1%、0.5%、又は0.1%未満(特に約10%未満)の他の物質、例えば細胞物質、培養培地、他の核酸分子、化学的前駆体、又は他の化学物質を有する、ポリヌクレオチド又は核酸分子の調製を含む。具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗体をコードする核酸分子は、単離される又は精製される。

40

【0130】

特定の態様において、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)ポリペプチドに特異的に結合し、本明細書において開示されるアミノ酸配列を含む抗体、並びにApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)ポリペプチドへの結合をそのような抗体と競合する(例えば、用量依存的様式で)抗体、又はそのような抗体のものと同一エピトープに結合する抗体、をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが本明細書において提供される。

【0131】

ある特定の態様において、本明細書において開示される抗体の軽鎖又は重鎖をコードする

50

ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが本明細書において提供される。ポリヌクレオチドは、本明細書において開示される抗体のVH、VL、又はCDRをコードするヌクレオチド配列を含み得る(例えば、本明細書におけるTable 1(表1)~Table 4(表4)を参照されたい)。

【0132】

例えばコドン/RNA最適化、異種シグナル配列での置き換え、及びmRNA不安定エレメントの排除によって最適化される、抗ApoC3抗体をコードするポリヌクレオチドも本明細書において提供される。コドン変化を導入する又はmRNAにおける阻害領域を排除することによって、組み換え発現のための抗ApoC3抗体(例えば、軽鎖、重鎖、VHドメイン、又はVLドメイン)をコードする最適化核酸を作出する方法は、例えば米国特許第5,965,726号;第6,174,666号;第6,291,664号;第6,414,132号;及び第6,794,498号に記載される最適化法をそれに応じて適合させることによって実行され得る。例えば、RNA内の潜在的スプライス部位及び不安定エレメント(例えば、A/T又はA/Uリッチエレメント)を、核酸配列によってコードされるアミノ酸を変更することなく変異させて、組み換え発現のためにRNAの安定性を増加させ得る。変更は、例えば同一アミノ酸に対する代替的コドンを使用した、遺伝子コードの縮重を利用する。一部の実施形態において、1つ又は複数のコドンを変更して、保存的変異、例えば元のアミノ酸と類似の化学構造及び特性又は機能を有する類似のアミノ酸をコードすることが望ましくあり得る。そのような方法は、最適化されていないポリヌクレオチドによってコードされる抗ApoC3抗体の発現と比べて、抗ApoC3の発現を少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、若しくは100倍、又はそれを上回る割合増加させ得る。

10

20

【0133】

ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体(例えば、VLドメイン又はVHドメイン)をコードする最適化ポリヌクレオチド配列は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体(例えば、VLドメイン又はVHドメイン)をコードする非最適化ポリヌクレオチド配列のアンチセンス(例えば、相補的)ポリヌクレオチドにハイブリダイズし得る。具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体又はフラグメントをコードする最適化ヌクレオチド配列は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体をコードする非最適化ポリヌクレオチド配列のアンチセンスポリヌクレオチドに、高ストリンジエンシーな条件下でハイブリダイズする。具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体をコードする最適化ヌクレオチド配列は、本明細書において開示される抗ApoC3抗体をコードする非最適化ヌクレオチド配列のアンチセンスポリヌクレオチドに、高ストリンジエンシーな、中間の、又はより低いストリンジエンシーなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件に関する情報は記載されており、例えば参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公報第US 2005/0048549号(例えば、段落72~73)を参照されたい。

30

【0134】

当技術分野において公知の任意の方法によって、ポリヌクレオチドは獲得され得、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は決定され得る。本明細書において開示される抗体、例えばTable 1(表1)~Table 5(表5)に記載される抗体、及びこれらの抗体の改変型をコードするヌクレオチド配列は、当技術分野において周知の方法を使用して決定され得る、すなわち、特定のアミノ酸をコードすることが公知のヌクレオチドコドン、抗体をコードする核酸を作出するように組み立てる。抗体をコードするようなポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから組み立てられ得(例えば、Kutmeier Gら、(1994)、BioTechniques 17:242~6頁に記載される)、それは、簡潔には、抗体をコードする配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、並びに次いで、ライゲーションされたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を伴う。

40

【0135】

50

或いは、本明細書において開示される抗体をコードするポリヌクレオチドは、当技術分野において周知の方法(例えば、PCR及び他の分子クローニング法)を使用して、適切な供給源(例えば、ハイブリドーマ)由来の核酸から作出され得る。例えば、既知の配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用したPCR増幅は、関心対象の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から獲得されたゲノムDNAを使用して実施され得る。そのようなPCR増幅法を使用して、抗体の軽鎖又は重鎖をコードする配列を含む核酸を獲得し得る。そのようなPCR増幅法を使用して、抗体の可変軽鎖領域又は可変重鎖領域をコードする配列を含む核酸を獲得し得る。増幅された核酸を、宿主細胞における発現のための及び更なるクローニングのためのベクターにクローニングして、例えばキメラ及びヒト化抗体を作出し得る。

10

【0136】

特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンは入手不能であるが、抗体分子の配列が既知である場合、免疫グロブリンをコードする核酸を化学的に合成して、又は配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用したPCR増幅によって、若しくは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用したクローニングによって、適切な供給源(例えば、抗体cDNAライブラリー、或いは本明細書において開示される抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞等の、抗体を発現する任意の組織若しくは細胞から作出されたcDNAライブラリー、又はそれから単離された核酸、好ましくはポリA⁺ RNA)から獲得して、例えば抗体をコードするcDNAライブラリー由来のcDNAクローンを同定し得る。PCRによって作出された増幅された核酸は、次いで、当技術分野において周知の任意の方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

20

【0137】

本明細書において開示される抗ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗体をコードするDNAは容易に単離され得、従来の手順(例えば、抗ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる)を使用して配列決定され得る。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの供給源として働き得る。単離され次第、DNAは発現ベクター内に置かれ得、次いでそれを、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(例えば、CHO GS System(商標)(Lonza社)からのCHO細胞)、又は免疫グロブリンタンパク質をそれ以外では産生しない骨髓腫細胞等の宿主細胞にトランスフェクトして、組み換え宿主細胞において抗ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗体の合成を獲得する。

30

【0138】

抗体全体を作出するために、VH又はVLヌクレオチド配列、制限部位、及び制限部位を保護する隣接配列を含むPCRプライマーを使用して、scFvクローンにおいてVH又はVL配列を増幅し得る。当業者に公知のクローニング技法を利用して、PCR増幅されたVHドメインは、重鎖定常領域、例えばヒトガンマ4定常領域を発現するベクターにクローニングされ得、PCR増幅されたVLドメインは、軽鎖定常領域、例えばヒトカッパ又はラムダ定常領域を発現するベクターにクローニングされ得る。ある特定の実施形態において、VH又はVLドメインを発現させるためのベクターは、EF-1 α プロモーター、分泌シグナル、可変領域、定常ドメインに対するクローニング部位、及びネオマイシン等の選択マーカーを含む。VH及びVLドメインは、必要な定常領域を発現する1つのベクターにもクローニングされ得る。次いで、当業者に公知の技法を使用して、重鎖変換ベクター及び軽鎖変換ベクターを細胞株に共トランスフェクトして、全長抗体、例えばIgGを発現する安定な又は一過性の細胞株を作出する。

40

【0139】

DNAは、例えば、マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインに対するコード配列を置換することによって、又は非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列のすべて若しくは一部を、免疫グロブリンコード配列に共有結合で接合することによっても

50

改変され得る。

【0140】

高ストリンジェンシーな、中間の、又はより低いストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件下で、本明細書において開示される抗体をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドも提供される。具体的な実施形態において、本明細書において開示されるポリヌクレオチドは、本明細書において提供されるVHドメイン又はVLドメインをコードするポリヌクレオチドに、高ストリンジェンシーな、中間の、又はより低いストリンジェンシーなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

【0141】

ハイブリダイゼーション条件は当技術分野において記載されており、当業者に公知である。例えば、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、約45℃における6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのフィルターに結合しているDNAへのハイブリダイゼーション、それに続く約50～65℃における0.2×SSC/0.1%SDS中での1回又は複数回の洗浄を伴い得る;高ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、約45℃における6×SSC中でのフィルターに結合している核酸へのハイブリダイゼーション、それに続く約68℃における0.1×SSC/0.2%SDS中での1回又は複数回の洗浄を伴い得る。他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションは、当業者に公知であり、記載されており、例えばAusubel FMら、編、(1989)Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、Green Publishing Associates, Inc.及びJohn Wiley & Sons, Inc.、New York、6.3.1～6.3.6頁及び2.10.3頁を参照されたい。

10

20

【0142】

ある特定の態様において、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する本明細書において開示される抗体を発現する(例えば、組み換えで)細胞(例えば、宿主細胞)、及び関連ポリヌクレオチド、及び発現ベクターが本明細書において提供される。宿主細胞における、好ましくは哺乳類細胞における組み換え発現のための、抗ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗体又はフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター(例えば、発現ベクター)が本明細書において提供される。本明細書において開示される抗ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗体(例えば、ヒト又はヒト化抗体)を組み換えで発現させるためのそのようなベクターを含む宿主細胞も本明細書において提供される。特定の態様において、宿主細胞からそのような抗体を発現させる工程を含む、本明細書において開示される抗体を産生するための方法が本明細書において提供される。

30

【0143】

ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する本明細書において開示される抗体(例えば、本明細書において開示される全長抗体、抗体の重鎖若しくは軽鎖、又は一本鎖抗体)の組み換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を伴う。本明細書において開示される抗体分子、抗体の重鎖又は軽鎖(例えば、重鎖又は軽鎖可変領域)をコードするポリヌクレオチドが獲得され次第、抗体分子の産生のためのベクターは、当技術分野において周知の技法を使用した組み換えDNA技術によって産生され得る。故に、抗体又は抗体フラグメント(例えば、軽鎖又は重鎖)をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによってタンパク質を調製するための方法が本明細書において開示される。当業者に周知である方法を使用して、抗体又は抗体フラグメント(例えば、軽鎖又は重鎖)コード配列、並びに適当な転写及び翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築し得る。これらの方法には、例えばインビトロ組み換えDNA技法、合成技法、及びインビボ遺伝子組み換えが含まれる。プロモーターに作動的に連結された、本明細書において開示される抗体分子、抗体の重鎖若しくは軽鎖、抗体の重鎖若しくは軽鎖可変領域、又は重鎖若しくは軽鎖CDR、をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターも提供される。そのようなベクターは、例えば抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含み得(例えば、国際公

40

50

報W086/05807号及びW089/01036号;並びに米国特許第5,122,464号を参照されたい)、抗体の可変領域は、重鎖全体、軽鎖全体、又は重鎖全体及び軽鎖全体の両方の発現のためのそのようなベクターにクローニングされ得る。

【0144】

発現ベクターは、従来の技法によって細胞(例えば、宿主細胞)に移行され得、結果として生じた細胞は、次いで従来の技法によって培養されて、本明細書において開示される抗体を産生し得る。故に、宿主細胞におけるそのような配列の発現のためにプロモーターに作動的に連結された、本明細書において開示される抗体、又はその重鎖若しくは軽鎖、又はそのフラグメント、又は本明細書において開示される一本鎖抗体、をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞が本明細書において提供される。ある特定の実施形態において、二本鎖抗体の発現に関しては、下記で詳述されるように、重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターを、免疫グロブリン分子全体の発現のために、宿主細胞において個々に共発現させ得る。ある特定の実施形態において、宿主細胞は、本明細書において開示される抗体の重鎖及び軽鎖の両方をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含有する。具体的な実施形態において、宿主細胞は、2つの異なるベクターを含有し、第1のベクターは、本明細書において開示される抗体の重鎖若しくは重鎖可変領域、又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含み、第2のベクターは、本明細書において開示される抗体の軽鎖若しくは軽鎖可変領域、又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。他の実施形態において、第1の宿主細胞は、本明細書において開示される抗体の重鎖若しくは重鎖可変領域、又はそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む第1のベクターを含み、第2の宿主細胞は、本明細書において開示される抗体の軽鎖若しくは軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む。具体的な実施形態において、第1の細胞によって発現される重鎖/重鎖可変領域を、第2の細胞の軽鎖/軽鎖可変領域と結び付けて、本明細書において開示される抗ApoC3抗体を形成する。ある特定の実施形態において、そのような第1の宿主細胞及びそのような第2の宿主細胞を含む、宿主細胞の集団が本明細書において提供される。

10

20

【0145】

特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体の軽鎖/軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第1のベクターと、本明細書において開示される抗ApoC3抗体の重鎖/重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第2のベクターとを含む、ベクターの集団が本明細書において提供される。

30

【0146】

多様な宿主-発現ベクターシステムを利用して、本明細書において開示される抗体分子を発現させ得る(例えば、米国特許第5,807,715号を参照されたい)。そのような宿主発現システムは、関心対象のコード配列が産生され得、その後精製され得るビヒクルであるが、適当なヌクレオチドコード配列で形質転換された又はトランスフェクトされた場合に、本明細書において開示される抗体分子をインサイチュウで発現し得る細胞でもある。これらには、抗体コード配列を含有する組み換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌及び*B. サブティリス*(*B. subtilis*))等の微小生物;抗体コード配列を含有する組み換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、*サッカロマイセス・ピキア*(*Saccharomyces Pichia*));抗体コード配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞システム;抗体コード配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)を感染させた、若しくは組み換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換された植物細胞システム(例えば、*クラミドモナス*(*Chlamydomonas reinhardtii*)等の緑藻類);又は、哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター(例えば、メタロチオネインプロモーター)若しくは哺乳類ウイルスに由来するプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含有する組み換え発現構築物を持つ哺乳類細胞システム(例えば、COS(例えば、COS1又はCOS)、CHO、

40

50

BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、及びNIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、並びにBMT10細胞)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗体を発現させるための細胞は、CHO細胞、例えばCHO GS System(商標)(Lonza社)からのCHO細胞である。特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体を発現させるための細胞は、ヒト細胞、例えばヒト細胞株である。具体的な実施形態において、哺乳類発現ベクターは、pOptiVEC(商標)、pCDNA3.3、又はpCDNA3.1Neoである。特定の実施形態において、とりわけ組み換え抗体分子全体の発現のための、大腸菌(*Escherichia coli*)等の細菌細胞又は真核細胞(例えば、哺乳類細胞)が、組み換え抗体分子の発現に使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中初期遺伝子プロモーターエレメント等のベクターと併用したチャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞等の哺乳類細胞は、抗体に対する有効な発現システムである(Foecking MK & Hofstetter H(1986)Gene 45:101~5頁;及びCockett MIら、(1990)Biotechnology 8(7):662~7頁)。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体は、CHO細胞又はNS0細胞によって産生される。具体的な実施形態において、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する本明細書において開示される抗体をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、又は組織特異的プロモーターによって調節される。

10

20

30

40

50

【0147】

細菌システムでは、いくつかの発現ベクターが、発現される抗体に対して意図される使用に応じて有利に選択され得る。例えば、大量のそのような抗体が産生されるべきである場合、抗体分子の医薬組成物の作出のために、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を指揮するベクターが望ましくあり得る。そのようなベクターには、融合タンパク質が産生されるように、抗体コード配列がlac Zコード領域とインフレームでベクターに個々にライゲーションされ得る、大腸菌発現ベクターpUR278(Ruether U & Mueller-Hill B(1983)EMBO J 2:1791~1794頁);pINベクター(Inouye S & Inouye M(1985)Nuc Acids Res 13:3101~3109頁;Van Heeke G & Schuster SM(1989)J Biol Chem 24:5503~5509頁);等が含まれるが、それらに限定されるわけではない。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるために、pGEXベクターも使用され得る。一般的に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズへの吸着及び結合、それに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解した細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物がGST部分から解放され得るように、トロンピン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0148】

昆虫システムでは、例えばオートグラファ・カリフォルニア(*Autographa californica*)核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして使用して、外来遺伝子を発現させ得る。ウイルスは、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞内で成長する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)内に個々にクローニングされ得、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置かれ得る。

【0149】

哺乳類宿主細胞では、いくつかのウイルスベースの発現システムが利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、関心対象の抗体コード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーター及び3部構成(tripartite)リーダー配列にライゲーションされ得る。このキメラ遺伝子は、次いで、インビトロ又はインビボ組み換えによってアデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、E1又はE3領域)への挿入は、生存能力があり、感染した宿主において抗体分子

を発現させ得る組み換えウイルスをもたらすであろう(例えば、Logan J & Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655~9頁を参照されたい)。挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のために、特異的な開始シグナルも要求され得る。これらのシグナルは、ATG開始コドン及び近接配列を含む。更に、開始コドンは、インサート全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと同調しなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然でも合成でも、多様な起源のものであり得る。発現の効率は、適当な転写エンハンサーエレメント、転写終結因子等の包含によって増強され得る(例えば、Bitter Gら、(1987)Methods Enzymol. 153:516~544頁を参照されたい)。

【0150】

加えて、挿入された配列の発現を変調する、又は望まれる特異的な形式で遺伝子産物を修飾し及びプロセッシングする宿主細胞系統が選定され得る。タンパク質産物のそのような修飾(例えば、グリコシル化)及びプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に重要であり得る。種々の宿主細胞が、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセッシング及び修飾のための特徴的で特異的なメカニズムを有する。適当な細胞株又は宿主システムを選定して、発現される外来タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にし得る。この目標のために、一次転写産物の適正なプロセッシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化のための細胞機構を所有する真核宿主細胞が使用され得る。そのような哺乳類宿主細胞には、CHO、VERO、BHK、Hela、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20及びT47D、NS0(いかなる免疫グロブリン鎖も内因的に産生しないマウス骨髄腫細胞株)、CRL7030、COS(例えば、COS1又はCOS)、PER.C6、VERO、Hs578Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10、並びにHs578Bst細胞が含まれるが、それらに限定されるわけではない。ある特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗体は、CHO細胞等の哺乳類細胞において産生される。

【0151】

具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗体は、低下したフコース含有量を有する又はフコース含有量を有しない。そのような抗体は、当業者に公知の技法を使用して産生され得る。例えば、抗体は、フコシル化する能力を欠損した又は欠如した細胞において発現され得る。具体的な例では、 $\alpha 1,6$ -フコシルトランスフェラーゼの両アレルのノックアウトを有する細胞株を使用して、低下したフコース含有量を有する抗体を産生し得る。Potelligent(登録商標)システム(Lonza社)は、低下したフコース含有量を有する抗体を産生するために使用され得るそのようなシステムの例である。

【0152】

組み換えタンパク質の長期にわたる高収率の産生のために、安定な発現細胞が作出され得る。例えば、本明細書において開示される抗ApoC3抗体を安定に発現する細胞株が操作され得る。具体的な実施形態において、本明細書において提供される細胞は、軽鎖/軽鎖可変領域及び重鎖/重鎖可変領域を安定に発現し、それは結び付いて、本明細書において開示される抗体を形成する。

【0153】

ある特定の態様において、ウイルスの複製の起点を含有する発現ベクターを使用するのではなくむしろ、宿主細胞は、適当な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写終結因子、ポリアデニル化部位等)、及び選択可能マーカーによって制御されるDNAで形質転換され得る。外来DNA/ポリヌクレオチドの導入後、操作された細胞を、富化培地中で1~2日間成長させ得、次いで選択培地に切り替えられる。組み換えプラスミド内の選択可能マーカーは、選択に対する耐性を付与し、細胞がそれらの染色体にプラスミドを安定に組み込み、成長して巣(foci)を形成するのを可能にし、それは今度はクローン化され得、細胞株に増殖され得る。この方法を有利に使用して、本明細書において開示される抗ApoC3抗体を発現する細胞株を操作し得る。そのような操作さ

10

20

30

40

50

れた細胞株は、抗体分子と直接的又は間接的に相互作用する組成物のスクリーニング及び評価において特に有用であり得る。

【0154】

それぞれtk⁻、hgp^{rt}、又はap^{rt}-細胞における、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler Mら、(1977)Cell 11(1):223~32頁)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラー(Szybalska EH & Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026~2034頁)、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy Iら、(1980)Cell 22(3):817~23頁)遺伝子を含むがそれらに限定されない、いくつかの選択システムが使用され得る。また、抗代謝産物耐性を、以下の遺伝子に対する選択の根拠として使用し得る:メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr(Wigler Mら、(1980)PNAS 77(6):3567~70頁;O'Hare Kら、(1981)PNAS 78:1527~31頁);ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt(Mulligan RC & Berg P(1981)PNAS 78(4):2072~6頁);アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo(Wu GY & Wu CH(1991)Biotherapy 3:87~95頁;Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573~596頁;Mulligan RC(1993)Science 260:926~932頁;及びMorgan RA & Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191~217頁;Nabel GJ & Feigler PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211~5頁);及び、ハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygro(Santerre RFら、(1984)Gene 30(1-3):147~56頁)。組み換えDNA技術の技術分野において一般に公知の方法をルーチンの適用して、所望の組み換えクローンを選択し得、そのような方法は、参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れる、例えばAusubel FMら、(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY(1993);Kriegler M、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY(1990);並びに、第12章及び第13章、Dracopoli NCら、(編)、Current Protocols in Human Genetics、John Wiley & Sons、NY(1994);Colbere-Garapin Fら、(1981)J Mol Biol 150:1~14頁に記載されている。

【0155】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加し得る(概説に関しては、Bebbington CR & Hentschel CCG、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning、第3巻(Academic Press、New York、1987)を参照されたい)。抗体を発現するベクターシステムにおけるマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養下に存在する阻害剤のレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加させるであろう。増幅された領域は抗体遺伝子と関連することから、抗体の産生も増加するであろう(Crouse GFら、(1983)Mol Cell Biol 3:257~66頁)。

【0156】

第1のベクターは重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2のベクターは軽鎖由来ポリペプチドをコードする、本明細書において記載される2つ以上の発現ベクターを宿主細胞に共トランスフェクトし得る。2つのベクターは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同一の選択可能マーカーを含有し得る。宿主細胞に、異なる量の2つ以上の発現ベクターを共トランスフェクトし得る。例えば、宿主細胞に、第1の発現ベクター及び第2の発現ベクターの以下の比率: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、又は1:50のいずれか1つをトランスフェクトし得る。

【0157】

或いは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードし及び発現し得る単一のベクターを使用し得る。そのような状況において、軽鎖は、過度の有毒な遊離重鎖を回避するために、重鎖の前に置かれるべきである(Proudfoot NJ(1986)Nature 322:562~565頁;及びKohler G(1980)PNAS 77:2197~2199頁)。重鎖及び軽鎖に対するコード配列は、cDNA又はゲノムDNAを含み得る。発現ベクターは、単シストロン性又はマルチシス

トロン性であり得る。マルチシストロン性の核酸構築物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、若しくはそれを上回る数の、又は2～5、5～10、若しくは10～20個の値域内の遺伝子/ヌクレオチド配列をコードし得る。例えば、2シストロン性の核酸構築物は、以下の順序で、プロモーター、第1の遺伝子(例えば、本明細書において開示される抗体の重鎖)、及び第2の遺伝子(例えば、本明細書において開示される抗体の軽鎖)を含み得る。そのような発現ベクターにおいて、両遺伝子の転写はプロモーターによって推進され得、一方で第1の遺伝子からのmRNAの翻訳はcap依存性スキャンメカニズムによるものであり得、第2の遺伝子からのmRNAの翻訳はcap非依存性メカニズムによる、例えばIRESによるものであり得る。

【0158】

本明細書において開示される抗体分子が組み換え発現によって産生され次第、それは、免疫グロブリン分子の精製のために当技術分野において公知の任意の方法によって、例えばクロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、特にプロテインAの後の特異的抗原に対するアフィニティーによる、及びサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差別的溶解度によって、又はタンパク質の精製のための他の任意の標準的技法によって精製され得る。更に、本明細書において開示される抗体を、本明細書において開示される又は当技術分野において別様に公知の異種ポリペプチド配列に融合させて、精製を容易にし得る。

【0159】

具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗体は、単離される又は精製される。一般的に、単離された抗体は、単離された抗体とは異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に不含であるものである。例えば、特定の実施形態において、本明細書において開示される抗体の調製物は、細胞物質又は化学的前駆体を実質的に不含である。「細胞物質を実質的に不含である」という言葉は、抗体が、それが単離される又は組み換えで産生される細胞の細胞成分から分離されている、抗体の調製物を含む。故に、細胞物質を実質的に不含である抗体には、約30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%、又は0.1%(乾燥重量で)未満の異種タンパク質(本明細書において「混入タンパク質」とも称される)又は抗体のバリエーション、例えば抗体の異なる翻訳後修飾形態又は抗体の他の異なるバリエーション(例えば、抗体フラグメント)を有する抗体の調製物が含まれる。抗体が組み換えで産生される場合、それは一般的に培養培地も不含であり、すなわち培養培地は、タンパク質調製物の体積の約20%、10%、2%、1%、0.5%、又は0.1%未満である。抗体が化学合成によって産生される場合、それは一般的に化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に不含であり、すなわちそれは、タンパク質の合成に伴う化学的前駆体又は他の化学物質から分離されている。従って、抗体のそのような調製物は、関心対象の抗体以外に、約30%、20%、10%、又は5%(乾燥重量で)未満の化学的前駆体又は化合物を有する。具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗体は、単離される又は精製される。

【0160】

ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する抗体は、抗体の合成のための当技術分野において公知の任意の方法によって、例えば化学合成によって又は組み換え発現技法によって産生され得る。本明細書において開示される方法は、別様に示されていない限り、分子生物学、微生物学、遺伝分析、組み換えDNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチド合成及び修飾、核酸ハイブリダイゼーション、並びに当技術分野の技能の範囲内にある関連分野における従来の技法を採用する。これらの技法は、例えば本明細書において引用される参考文献に記載されており、文献において十分に説明されている。例えば、Maniatis Tら、(1982)Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook Jら、(1989)、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第2編、Cold Spring Harbor Laboratory Press;Sambrook Jら、(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY;Ausub

10

20

30

40

50

el FMら、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons(1987年及び年次更新);Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons(1987年及び年次更新);Gait(編)(1984)Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach、IRL Press;Eckstein(編)(1991)Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach、IRL Press;Birren Bら、(編)(1999)Genome Analysis:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

【0161】

具体的な実施形態において、本明細書において開示される抗体は、DNA配列の、例えば合成、遺伝子操作による、創出を伴う任意の手段によって調製された、発現した、創出された、又は単離された抗体(例えば、組み換え抗体)である。ある特定の実施形態において、そのような抗体は、インビボでの動物又は哺乳類(例えば、ヒト)の抗体生殖細胞系列レパートリーの中に天然に存在しない配列(例えば、DNA配列又はアミノ酸配列)を含む。

10

【0162】

1つの態様において、本明細書において開示される細胞又は宿主細胞を培養する工程を含む、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する抗体を作製する方法が本明細書において提供される。ある特定の態様において、本明細書において開示される細胞又は宿主細胞(例えば、本明細書において開示される抗体をコードするポリヌクレオチドを含む細胞又は宿主細胞)を使用して抗体を発現させる(例えば、組み換えで発現させる)工程を含む、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する抗体を作製する方法が本明細書において提供される。特定の実施形態において、細胞は単離された細胞である。特定の実施形態において、外因性ポリヌクレオチドが細胞に導入されている。特定の実施形態において、方法は、細胞又は宿主細胞から獲得された抗体を精製する工程を更に含む。

20

【0163】

ポリクローナル抗体を産生するための方法は、当技術分野において公知である(例えば、Short Protocols in Molecular Biologyにおける第11章、(2002)、第5編、Ausubel FMら、編、John Wiley and Sons、New Yorkを参照されたい)。

【0164】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組み換え、及びファージディスプレイ技術、又はその組み合わせの使用を含めた、当技術分野において公知の多種多様な技法を使用して調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の及び例えばHarlow E & Lane D、Antibodies:A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2編、1988);Hammerling GJら:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681(Elsevier、N.Y.、1981)において教示されるものを含めた、ハイブリドーマ技法を使用して産生され得る。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術により産生される抗体に限定されるわけではない。例えば、モノクローナル抗体は、本明細書において開示される抗体、例えばそのような抗体の軽鎖又は重鎖を外因的に発現する宿主細胞から組み換えで産生され得る。

30

【0165】

具体的な実施形態において、本明細書において使用される「モノクローナル抗体」とは、単一細胞(例えば、組み換え抗体を産生するハイブリドーマ又は宿主細胞)によって産生される抗体であり、抗体は、例えば当技術分野において公知の又は本明細書において提供される実施例におけるELISA又は他の抗原結合若しくは競合結合アッセイによって判定される、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、キメラ抗体又はヒト化抗体であり得る。ある特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、一価抗体又は多価(例えば、二価)抗体である。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、単一特異性又は多特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)である。本明細書において開示されるモノクローナル抗体は、例えばKohler G & Milstein C(1975)Nature 256:495頁に記載されるハイブリドーマ

40

50

マ法によって作製され得る、又は例えば本明細書において開示される技法を使用してファージライブラリーから例えば単離され得る。クローン細胞株の調製及びそれによって発現されるモノクローナル抗体の調製のための他の方法は、当技術分野において周知である(例えば、上記Short Protocols in Molecular Biologyにおける第11章、(2002)、第5編、Ausubel FMらを参照されたい)。

【0166】

ハイブリドーマ技術を使用して特異的抗体を産生する及びスクリーニングするための方法はルーチン的であり、当技術分野において周知である。例えば、ハイブリドーマ法では、マウス、又はヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、ハムスター、若しくはマカクザル等の他の適当な宿主動物に免疫付与して、免疫付与に使用されるタンパク質(例えば、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3))に特異的に結合するであろう抗体を産生する又は産生し得るリンパ球を引き出す。或いは、リンパ球にインビトロで免疫付与し得る。次いで、ポリエチレングリコール等の適切な融合剤を使用してリンパ球を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding JW(編)、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、59~103頁(Academic Press、1986))。加えて、RIMS(反復免疫付与多重部位(repetitive immunization multiple site))技法を使用して、動物に免疫付与し得る(参照によりその全体として組み入れられる、Kilpatrick KEら、(1997)Hybridoma 16:381~9頁)。

10

【0167】

一部の実施形態において、マウス(又は、ラット、サル、ロバ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、若しくはイヌ等の他の動物)に抗原(例えば、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3))を免疫付与し得、免疫応答が検出され次第、例えば抗原に特異的な抗体がマウス血清中に検出され次第、マウス脾臓を摘出し、脾細胞を単離する。次いで、脾細胞を周知の技法によって任意の適切な骨髓腫細胞、例えばアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC(登録商標))(Manassas、VA)から入手可能な細胞株SP20由来の細胞に融合させて、ハイブリドーマを形成する。ハイブリドーマを、限界希釈によって選択し及びクローン化する。ある特定の実施形態において、免疫付与されたマウスのリンパ節を摘出し、NS0骨髓腫細胞と融合させる。

20

【0168】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親骨髓腫細胞の成長又は生存を阻害する1つ又は複数の物質を好ましくは含有する適切な培養培地中に播種し及び成長させる。例えば、親骨髓腫細胞がヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)酵素を欠如する場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的にヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むと考えられ(HAT培地)、その物質はHGPRT欠損細胞の成長を阻止する。

30

【0169】

具体的な実施形態は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を支持し、HAT培地等の培地に感受性である骨髓腫細胞を採用する。これら骨髓腫細胞株の中には、NS0細胞株、又はSalk Institute Cell Distribution Center、San Diego、CA、USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍に由来するもの、並びにアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville、MD、USAから入手可能なSP-2若しくはX63-Ag8.653細胞等のマウス骨髓腫株がある。ヒトモノクローナル抗体の産生に関して、ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株も記載されている(Kozbor D(1984)J Immunol 133:3001~5頁;Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63頁(Marcel Dekker, Inc.、New York、1987))。

40

【0170】

ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地を、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に向けられたモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、当技術分野において公知の

50

方法、例えば免疫沈降によって、又はラジオイムノアッセイ(RIA)若しくは酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)等のインビトロ結合アッセイによって判定される。

【0171】

所望の特異性、アフィニティー、又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを、限界希釈手順によってサブクローニングし得、標準的方法によって成長させ得る(上記Goding JW(編)、Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)。この目的のための適切な培養培地には、例えばD-MEM又はRPMI 1640培地が含まれる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで成長し得る。

【0172】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地、腹水、又は血清から適切に分離される。

【0173】

本明細書において開示される抗体には、特異的ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)を認識し、当業者に公知の任意の技法によって作出され得る抗体フラグメントが含まれる。例えば、本明細書において開示されるFab及びF(ab')₂フラグメントは、パパイン(Fabフラグメントを産生する)又はペプシン(F(ab')₂フラグメントを産生する)等の酵素を使用した、免疫グロブリン分子のタンパク質分解的切断によって産生され得る。Fabフラグメントは、抗体分子の2本の同一アームの一方に相当し、重鎖のVH及びCH1ドメインと対合した完全な軽鎖を含有する。F(ab')₂フラグメントは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合によって連結した、抗体分子の2本の抗原結合アームを含有する。

【0174】

更に、本明細書において開示される抗体は、当技術分野において公知の様々なファージディスプレイ法を使用しても作出され得る。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面に呈示される。特に、VH及びVLドメインをコードするDNA配列は、動物cDNAライブラリー(例えば、罹患組織のヒト又はマウスcDNAライブラリー)から増幅される。VH及びVLドメインをコードするDNAは、PCRによってscFvリンカーとともに再結合され、ファージミドベクターにクローニングされる。ベクターを大腸菌にエレクトロポレーションし、大腸菌にヘルパーファージを感染させる。これらの方法において使用されるファージは、典型的に、fd及びM13を含めた繊維状ファージであり、VH及びVLドメインは、通常、ファージ遺伝子III又は遺伝子VIIIのいずれかに組み換えで融合される。例えば標識された抗原又は固体表面若しくはビーズに結合した若しくは捕捉された抗原を使用して、特定の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージが選択され得る又は抗原とともに同定され得る。本明細書において開示される抗体を作製するために使用され得るファージディスプレイ法の例には、Brinkman Uら、(1995)J Immunol Methods 182:41~50頁;Ames RSら、(1995)J Immunol Methods 184:177~186頁;Kettleborough CAら、(1994)Eur J Immunol 24:952~958頁;Persic Lら、(1997)Gene 187:9~18頁;Burton DR & Barbas CF(1994)Advan Immunol 57:191~280頁;PCT出願第PCT/GB91/001134号;国際公報WO90/02809号、WO91/10737号、WO92/01047号、WO92/18619号、WO93/11236号、WO95/15982号、WO95/20401号、及びWO97/13844;並びに米国特許第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号、及び第5,969,108号に開示されるものが含まれる。

【0175】

上記の参考文献に記載されるように、ファージ選択の後、ファージ由来の抗体コード領域を単離し得、それを使用して、ヒト抗体を含めた抗体全体、又は他の任意の所望の抗原結

10

20

30

40

50

合フラグメントを作出し得、例えば下で記載されるように、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含めた任意の所望の宿主において発現させ得る。Fab、Fab'、及びF(ab')₂フラグメント等の抗体フラグメントを組み換えで産生する技法も、PCT公報WO92/22324号;Mullinax RLら、(1992)BioTechniques 12(6):864~9頁;Sawai Hら、(1995)Am J Reprod Immunol 34:26~34頁;及びBetter Mら、(1988)Science 240:1041~1043頁に開示されるもの等の当技術分野において公知の方法を使用して採用され得る。

【0176】

ある特定の実施形態において、抗体全体を作出するために、VH又はVLヌクレオチド配列、制限部位、及び制限部位を保護する隣接配列を含むPCRプライマーを使用して、鋳型、例えばscFvクローンからVH又はVL配列を増幅し得る。当業者に公知のクローニング技法を利用して、PCR増幅されたVHドメインは、VH定常領域を発現するベクターにクローニングされ得、PCR増幅されたVLドメインは、VL定常領域、例えばヒトカップ又はラムダ定常領域を発現するベクターにクローニングされ得る。VH及びVLドメインは、必要な定常領域を発現する1つのベクターにもクローニングされ得る。次いで、当業者に公知の技法を使用して、重鎖変換ベクター及び軽鎖変換ベクターを細胞株に共トランスフェクトして、全長抗体、例えばIgGを発現する安定な又は一過性の細胞株を作出する。

【0177】

キメラ抗体とは、抗体の異なる部分が、異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。例えば、キメラ抗体は、ヒト抗体の定常領域に融合した、マウス又はラットモノクローナル抗体の可変領域を含有し得る。キメラ抗体を産生するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Morrison SL(1985)Science 229:1202~7頁;Oi VT & Morrison SL(1986)BioTechniques 4:214~221頁;Gillies SDら、(1989)J Immunol Methods 125:191~202頁;並びに米国特許第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号、及び第6,331,415号を参照されたい。

【0178】

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合し得、それは、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域、及び非ヒト免疫グロブリン(例えば、マウス免疫グロブリン)のアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分も、典型的にはヒト免疫グロブリンのものも含む。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、及びCH4領域も含み得る。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgEを含めた免疫グロブリンの任意のクラス、並びにIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含めた任意のアイソタイプから選択され得る。ヒト化抗体は、CDR移植(欧州特許第EP 239400号;国際公報WO91/09967号;並びに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、及び第5,585,089号)、ベニアリング(veneering)又は再舗装(resurfacing)(欧州特許第EP 592106号及び第EP 519596号;Padlan EA(1991)Mol Immunol 28(4/5):489~498頁;Studnicka GMら、(1994)Prot Engineering 7(6):805~814頁;並びにRoguska MAら、(1994)PNAS 91:969~973頁)、鎖シャッフリング(米国特許第5,565,332号)、並びに例えば米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公報WO93/17105号;Tan Pら、(2002)J Immunol 169:1119~25頁;Caldas Cら、(2000)Protein Eng. 13(5):353~60頁;Morea Vら、(2000)Methods 20(3):267~79頁;Baca Mら、(1997)J Biol Chem 272(16):10678~84頁;Roguska MAら、(1996)Protein Eng 9(10):895~904頁;Couto JRら、(1995)Cancer Res. 55(23補足):5973s~5977s頁;Couto JRら、(1995)Cancer Res 55(8):1717~22頁;Sandhu JS(1994)Gene 150(2):409~10頁、及びPedersen JTら、(1994)J Mol Biol 235(3):959~73頁に開示される技法を含むがそれらに限定されない、当技術分野において公知の多様な技法を使用して産生され得る。参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、米国出願公報第US 2005/0042664号A1(2005年2月24日)も参照されたい。

【0179】

多特異性(例えば、二重特異性抗体)を作製するための方法は記載されており、例えば米国特許第7,951,917号;第7,183,076号;第8,227,577号;第5,837,242号;第5,989,830号;第5,869,620号;第6,132,992号;及び第8,586,713号を参照されたい。

【0180】

単ドメイン抗体、例えば軽鎖を欠如する抗体は、当技術分野において周知の方法によって産生され得る。Riechmann L & Muyldermans S(1999)J Immunol 231:25~38頁;Nuttall SDら、(2000)Curr Pharm Biotechnol 1(3):253~263頁;Muyldermans S,(2001)J Biotechnol 74(4):277~302頁;米国特許第6,005,079号;並びに国際公報W094/04678号、W094/25591号、及びW001/44301号を参照されたい。

10

【0181】

更に、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合する抗体を今度は利用して、当業者に周知の技法を使用して、抗原を「模倣する」抗イディオタイプ抗体を作出し得る。(例えば、Greenspan NS & Bona CA(1989)FASEB J 7(5):437~444頁;及びNissinoff A(1991)J Immunol 147(8):2429~2438頁を参照されたい)。

【0182】

特定の実施形態において、本明細書において開示される抗ApoC3抗体と同じ、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)のエピトープに結合する本明細書において開示される抗体は、ヒト抗体である。特定の実施形態において、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)への結合から、本明細書において開示される抗体のいずれか1つを競合的に遮断する(例えば、用量依存的様式で)本明細書において開示される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野において公知の任意の方法を使用して産生され得る。例えば、機能的な内因性免疫グロブリンを発現することはできないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスが使用され得る。特に、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体が、マウス胚性幹細胞にランダムに又は相同組み換えによって導入され得る。或いは、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、及び多様性領域が、マウス胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組み換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入で別個に又は同時に非機能的になり得る。特に、J_H領域のホモ接合性欠失は、内因性の抗体産生を阻止する。改変された胚性幹細胞を増殖させ及び胚盤胞にマイクロインジェクションして、キメラマウスを産生する。次いで、キメラマウスを繁殖させて、ヒト抗体を発現するホモ接合型子孫を産生する。トランスジェニックマウスに、選択された抗原、例えば抗原(例えば、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3))のすべて又は一部を、通常の形式で免疫付与する。抗原に向けられたモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して、免疫付与されたトランスジェニックマウスから獲得され得る。トランスジェニックマウスによって持たれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、その後クラススイッチ及び体細胞変異を受ける。故に、そのような技法を使用して、治療上有用なIgG、IgA、IgM、及びIgE抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概説に関しては、Lonberg N & Huszar D(1995)Int Rev Immunol 13:65~93頁を参照されたい。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体を産生するため

20

30

40

この技術、並びにそのような抗体を産生するためのプロトコールについての詳細な考察に関しては、例えば国際公報W098/24893号、W096/34096号、及びW096/33735号;並びに米国特許第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号、及び第5,939,598号を参照されたい。ヒト抗体を産生し得るマウスの例には、Xenomouse(商標)(Abgenix社;米国特許第6,075,181号及び第6,150,184号)、HuAb-Mouse(商標)(Mederex社/Gen Pharm社;米国特許第5,545,806号及び第5,569,825号)、Trans Chromo Mouse(商標)(キリン社)、及びKM Mouse(商標)(Medarex社/キリン社)が含まれる。

【0183】

50

ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)に特異的に結合するヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用した上で記載されるファージディスプレイ法を含めた、当技術分野において公知の多様な方法によって作製され得る。米国特許第4,444,887号、第4,716,111号、及び第5,885,793号;並びに国際公報W098/46645号、W098/50433号、W098/24893号、W098/16654号、W096/34096号、W096/33735号、及びW091/10741号も参照されたい。

【0184】

一部の実施形態において、ヒト抗体は、マウス-ヒトハイブリドーマを使用して産生され得る。例えば、エプスタイン・バールウイルス(EBV)で形質転換されたヒト末梢血リンパ球をマウス骨髓腫細胞と融合させて、ヒトモノクローナル抗体を分泌するマウス-ヒトハイブリドーマを産生し得、これらのマウス-ヒトハイブリドーマをスクリーニングして、標的抗原(例えば、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3))に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を分泌するものを判定し得る。そのような方法は公知であり、当技術分野において記載されており、例えばShinmoto Hら、(2004)Cytotechnology 46:19~23頁;Naganawa Yら、(2005)Human Antibodies 14:27~31頁を参照されたい。

【0185】

6. キット

本明細書において開示される1つ若しくは複数の抗体、又はその医薬組成物若しくはコンジュゲートを含むキットも提供される。具体的な実施形態において、本明細書において提供される1つ又は複数の抗体等、本明細書において開示される医薬組成物の成分の1つ又は複数を充填された1つ又は複数の容器を含む医薬パック又はキットが本明細書において提供される。一部の実施形態において、キットは、本明細書において開示される医薬組成物、及び本明細書において開示されるもの等の任意の予防用又は治療用作用物質を含有する。そのような容器には、医薬品又は生物学的製品の製造、使用、又は販売を規制する行政機関によって命じられた形態の通知が任意で伴い得、通知は、ヒト投与のための製造、使用、又は販売についての機関による認可を反映する。

【0186】

上記の方法において使用され得るキットも提供される。1つの実施形態において、キットは、1つ又は複数の容器に、本明細書において開示される抗体、好ましくは精製された抗体を含む。具体的な実施形態において、本明細書において開示されるキットは、対照としての実質的に単離されたApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原を含有する。別の具体的な実施形態において、本明細書において開示されるキットは、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原と反応しない対照抗体を更に含む。別の具体的な実施形態において、本明細書において開示されるキットは、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原への抗体の結合を検出するための1つ又は複数の要素を含有する(例えば、抗体は、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物、若しくは発光性化合物等の検出可能な基質にコンジュゲートされ得る、又は一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質にコンジュゲートされ得る)。具体的な実施形態において、本明細書において提供されるキットは、組み換えで産生された又は化学合成されたApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原を含み得る。キットに提供されるApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原は、固体支持体に付着もされ得る。より具体的な実施形態において、上で記載されるキットの検出手段は、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原が付着している固体支持体を含む。そのようなキットは、非付着性レポーターで標識された抗ヒト抗体又は抗マウス/ラット抗体も含み得る。この実施形態において、ApoC3(例えば、ヒト又はカニクイザルApoC3)抗原への抗体の結合は、前記レポーターで標識された抗体の結合によって検出され得る。

【実施例】

【0187】

本出願者らは、ヒトApoC3に特異的に結合するが、カニクイザルApoC3への感知可能な

結合を呈しないモノクローナル抗体を以前に同定した(WO/2018/007999に記載される、クローン5E5)。本開示は、ヒト及びカニクイザルApoC3の両方に特異的に結合する、クローン5E5に由来する新規の抗ApoC3抗体を提供する。以下の実施例は、これら新規の抗体の作出及び特徴付けを記載する。新規の抗体のアミノ酸配列(amino sequence)は、本明細書におけるTable 1(表1)~Table 5(表5)に記載される。

【0188】

本節における実施例は、本出願の利点及び特質を更に明瞭にするために提供されるが、本出願の範囲を限定することを意図されるわけではない。

【0189】

(実施例1)

ヒト及びカニクイザルApoC3の両方に結合する抗体の同定

1.1 軽鎖シャッフリングファージライブラリーの作出及びスクリーニング

WO/2018/007999に記載されるように、抗ApoC3抗体クローン5E5を、ヒトApoC3を免疫付与されたラマに由来するファージライブラリー(以下、「5E5ライブラリー」)から以前に単離した。ヒト及びカニクイザルApoC3の両方に特異的に結合する新規の抗体を同定するために、5E5ライブラリー由来のVLのコード配列が、5E5 VHのコード配列とともにpSC1ファージミドベクターのApaLI及びAscI制限部位にサブクロニングされた新たなscFvファージライブラリーを作出し、それにより、結果として生じたファージライブラリーの個々のメンバーは、種々のVLとの組み合わせで5E5 VHを含むscFvをコードした。ライブラリーは、 10^8 を上回る多様性を有した。

【0190】

ヒト及びカニクイザルApoC3の両方に結合するscFvを富化するために、上で記載される軽鎖シャッフリングファージディスプレイライブラリーを使用したファージディスプレイ選択を、天然ヒト及び/又は組み換えカニクイザルApoC3の両方(それぞれ、nhuApoC3及びrcyApoC3)に対して実施した。2つの別個の選択戦略を採用した。第1の戦略では、nhuApoC3に対する第1のラウンドのパンニング選択、それに続くNeutrAvidinで捕捉されたビオチン化rcyApoC3に対する2つの連続ラウンドの選択において、ファージディスプレイライブラリーを選択した。第2の戦略では、NeutrAvidinで捕捉されたビオチン化rcyApoC3に対する2つの連続ラウンドにおいて、ファージディスプレイライブラリーを選択した。すべての選択に関して、溶出を、中性pH7.4でトリプシンを用いて実施した。対照として、天然huApoC3に対する選択を、rcyApoC3に対するすべての選択ラウンドと並行して実施した。ファージインプット及びアウトプットを滴定し及びスポットして、ファージ力価及びアウトプットサイズを判定した。富化を算出し、陰性対照選択(コートされていないウェル/PBS)と比較した。

【0191】

上で記載されるファージ富化の後、ファージ感染した大腸菌TG1の個々のコロニーを96ウェルマスタープレート(MP)に摘み入れた。2枚のMP(MP29及びMP30)からペリプラズム抽出物(可溶性モノクローナルscFvを含有する)を調製した。NeutrAvidinコートされたウェルに10nMで捕捉されたビオチン化nhuApoC3及びrcyApoC3抗原に対するscFvの能力をELISAによって判定した。scFvを、抗c-myc HRPコンジュゲート抗体(Bethyl社 #A190-105P)を1:5000希釈で使用して検出した。合計でMP29からの30クローン及びMP30からの76クローンが、rcyApoC3結合に対して陽性であった(rcyApoC3に対して0.100を上回るOD450nm値)。

【0192】

上で記載されるELISAアッセイからの陽性scFvクローンを、次いでSPRを使用してスクリーニングして、それらの標的会合及び解離特徴を評価した。ビオチン化huApoC3及びrcyApoC3を、メーカーの指示書に従って、ストレプトアビジンコートされたチップ(SA CHIP; GE Healthcare社 #BR100398)にpH7.4で捕捉した。簡潔には、20µlの10µg/mlのビオチン化抗原を、およそ500RUの表面密度に達するように注入した。ペリプラズム抽出物をHBS-EPバッファー、pH7.4(GE Healthcare社 #BR-1008-26)に

10

20

30

40

50

1.5倍で希釈し、これらの希釈された抽出物のそれぞれの60 μ lを注入し、30 μ l/分でフローセルを通過させた。オフレート洗浄をpH7.4で5分間実施した。解離後、10 μ lの10mM NaOH/1M NaCl、それに続く10 μ lのpH1.5の10mMグリシンを注入することによって、フローセル表面を再生した。

【0193】

結果として生じたセンサーグラムを、ラングミュア1:1結合モデルを適用したBIAevaluation 4.1ソフトウェアを用いて分析して、オフレートパラメーターを導き出した。データをゼロに調整し、参照セルセンサーグラムを差し引いた。オフレート値を、センサーグラムの解離相を使用して推定し、種々の抗原に関して各クローンに対して比較した。選択された抗体の結合特徴は、Table 6(表6)に示されている。

10

【0194】

【表6】

表6.SPRアフィニティー測定

scFv クローン ID	への結合	kd (1/s)	R0
5E5 WT	nhuApoC3	9.64E-04	854
	rcyApoC3	3.91E-02	14.1
29B03	nhuApoC3	5.72E-04	930
	rcyApoC3	4.18E-02	122
29A06	nhuApoC3	1.62E-03	1010
	rcyApoC3	4.06E-02	125
29A05	nhuApoC3	6.90E-03	545
	rcyApoC3	1.46E-02	145
29G02	nhuApoC3	4.35E-03	833
	rcyApoC3	7.21E-03	102
30D10	nhuApoC3	1.23E-03	695
	rcyApoC3	4.36E-02	11.4
29G11	nhuApoC3	6.33E-03	809
	rcyApoC3	7.14E-03	92.7
29F10	nhuApoC3	1.44E-03	808
	rcyApoC3	5.90E-02	52

20

30

【0195】

rcyApoC3に対するR0値が45RUを上回る場合(すなわち、WT 5E5クローンに対するR0値と比べて3倍)、nhuApoC3結合クローンはrcyApoC3にも結合すると思われる。ヒト及びカニクイザルApoC3の両方への結合を有するクローンを配列決定して、可変軽鎖の多様性を分析した。例示的なヒト及びカニクイザルApoC3結合抗体の配列は、本明細書におけるTable 1(表1)~Table 5(表5)に記載されている。

【0196】

40

(実施例2)

IgG抗体の産生及び精製

実施例1に記載されるELISA結合アッセイ及びSPR分析からのデータに基づき、Table 6(表6)におけるscFvクローンを、IgGフォーマット及び小スケールタンパク質産生に対して選択した。各可変領域をpCDNA3.1Neo哺乳類発現ベクターのBsmBI部位にクローニングすることによって、scFvクローンをIgGに対して再フォーマットした。

【0197】

抗体産生に関しては、50mlのExpiCHO-S細胞に、40 μ gのVH及びVL pCDNA3.1NeoプラスミドDNAをトランスフェクトし、8日間培養した。次いで、細胞を遠心分離によって除去し、上清を4℃で保管した。

50

【0198】

AKTA PureシステムでHiTrap MabSelect SuReカラム(GE社 #11-0034-94)を使用して、IgGを精製した。IgGをpH3.0の0.1Mクエン酸バッファーを使用して溶出し、中和のための0.1ml Tris-HCl pH9.0を含有するチューブ内に1.0ml画分として回収した。抗体含有画分をプールし、AKTA PureシステムでHiTrap脱塩カラムを使用して、1×リン酸緩衝生理食塩溶液(PBS; NaCl 137mM、KCl 3mM、Na₂HPO₄ 8mM、KH₂PO₄ 15mM、pH7.4)中で脱塩した。280nmにおける吸光度を測定し、減衰係数を以下のとおり: $(A_{280nm} - A_{340nm}) / \epsilon$ (g/Lでの減衰係数)に使用して補正することによって、タンパク質濃度を判定した。サンプルのサイズ及び純度を、還元及び非還元条件下でのSDS-PAGEによって確認した。

10

【0199】

(実施例3)

抗ApoC3 IgG抗体の結合特徴についての分析

本実施例では、実施例2に記載される全長IgGのSPR分析を実施して、ヒト及びカニクイザルApoC3を用いて、新規の軽鎖抗体の結合特徴を評価した。標的は、3つの形式: 固定された抗原、捕捉された抗原、及び捕捉されたmAbで提示された。

【0200】

3.1 固定された抗原を使用したSPR

天然huApoC3タンパク質を、CM5チップ(GE Healthcare社 #BR100012)に固定した。固定を、NHS/EDCキット(Biacore AB社)を使用して、Biacoreによって提供された方法に従って実施した。簡潔には、チップの活性化後、pH4.5の10mM酢酸バッファー中60 µg/mlのヒトApoC3の溶液を、表面密度がおよそ500RUに達するまで注入した。次いで、HBS-EPバッファー(GE社 #BR-1008-26; 0.010M HEPES、0.150M NaCl、3mM EDTA、0.05%(v/v) surfactant P20、pH7.4)中60 µLの1~100nMの試験抗体を注入し、30 µl/分でフローセルを通過させた。オフレート洗浄をpH7.4で5分間実施した。解離後、10 µlの10mM NaOH/1M NaCl、及び10 µlのpH1.5の10mMグリシンを注入することによって、フローセル表面を再生した。

20

【0201】

結果として生じたセンサーグラムを、ラングミュア1:1結合モデルを使用したBIAevaluation 4.1ソフトウェアを用いて分析して、結合反応速度を導き出した。データをゼロ調整し、参照セルセンサーグラムを差し引いた。試験したIgGクローンに対する算出された速度論的パラメーターの概説は、Table 7(表7)に提示されている。全体として、クローンは、ヒト標的に対する高いアフィニティー(WT参照5E5 IgGと同じ桁の)及び低いオフレート($k_d < 1.0E-4$ 1/s)値を有した。カニクイザル標的への特異的結合は、可変的なオフレート値を有して、試験したIgGクローンのほとんどに関して観察された。

30

【0202】

40

50

【表 7】

表7.固定された抗原を使用したアッセイに関するSPR結果

IgG クローン ID	への結合	MAb の濃 度(nM)	ka E+05 (1/Ms)	kd E- 04 (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	Chi2
5E5 WT	nhuApoC3	50-0.8	n/a				
29B03	nhuApoC3	12.5-0.8	n/a				
	rcyApoC3	12.5-0.8	3.8	0.67	460	0.18	0.7
29A06	nhuApoC3	12.5-0.8	9.5	0.65	1470	0.07	49.8
	rcyApoC3	12.5-0.8	5.0	0.75	658	0.15	1.7
29A05	nhuApoC3	12.5-0.8	5.2	0.82	865	0.16	2.8
	rcyApoC3	12.5-0.8	3.1	0.64	415	0.21	0.3
29G02	nhuApoC3	12.5-0.8	13.2	0.16	1290	0.01	14.9
	rcyApoC3	12.5-0.8	11.1	5.52	761	0.50	21.8
30D10	nhuApoC3	12.5-0.8	15.0	2.31	1780	0.15	852.0
	rcyApoC3		NS				
29G11	nhuApoC3	12.5-0.8	14.4	0.63	1490	0.04	131
	rcyApoC3	12.5-0.8	14.0	5.31	938	0.38	50
29F10	nhuApoC3	50-0.8	6.2	0.24	970	0.04	292
	rcyApoC3	50-0.8	2.8	7.74	467	2.79	11.1

センサーグラムは、ブランクチャネルを差し引き、分析物なしのブランクアッセイに対して二重参照された;n/a:適用なし;検出の限界を下回る kd:1E-06 1/s;NS:登録された結合曲線なし

【0203】

3.2 捕捉された抗原を使用したSPR

捕捉された抗原手法に関しては、ビオチン化天然ヒトApoC3を、ストレプトアビジンコートされたチップ(GE Healthcare社 #BR100032)にpH7.4で捕捉した。Biacoreによって提供された方法に従い、20μlの10μg/mlのビオチン化ヒトApoC3を、表面密度がおおよそ500RUに達するまで注入した。SPR法及びデータ分析は、実施例2.1に記載されるように従った。捕捉された抗原として29A06-Nhance抗体を用いても、これらの方法を使用してSPRを実施した。29A06-Nhance抗体は、配列番号38に記載される重鎖アミノ酸配列及び配列番号50に記載される軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0204】

試験したIgGクローンに対する算出された速度論的パラメーターの概説は、Table 8(表8)及びTable 9(表9)に提示されている。固定された抗原手法と同様に、クローンのほとんどは、ヒト標的に対する高いアフィニティー及び低いオフレート値を有した。加えて、カニクイザル標的への特異的結合は、可変的なオフレート値を有して、試験したIgGクローンのほとんどに関して観察された。

【0205】

10

20

30

40

50

【表 8】

表8.捕捉された抗原を使用したアッセイに関するSPR結果

IgG クローン ID	への結合	MAb の濃度 (nM)	ka E+05 (1/Ms)	kd E-04 (1/s)	Rmax (RU)	KD (nM)	Chi2
5E5 WT	bio-nhuApoC3	50-0.8	3.5	0.18	475	0.05	25
29B03	bio-nhuApoC3		n/a				
	bio-rcyApoC3	12.5-0.8	3.2	1.04	518	0.33	0.64
29A06	bio-nhuApoC3	12.5-0.8	9.6	0.42	1190	0.04	6.6
	bio-rcyApoC3	12.5-0.8	3.7	1.69	678	0.46	1.6
29A05	bio-nhuApoC3	12.5-0.8	5.0	0.63	762	0.13	1.4
	bio-rcyApoC3	12.5-0.8	2.7	1.75	475	0.65	0.57
29G02	bio-nhuApoC3	12.5-0.8	13.1	0.33	1100	0.02	38
	bio-rcyApoC3	12.5-0.8	7.5	2.75	846	0.37	8.3
30D10	bio-nhuApoC3	12.5-0.8	12.9	1.26	1770	0.10	77
	bio-rcyApoC3		NS				
29G11	bio-nhuApoC3	12.5-0.8	13.8	0.73	1320	0.05	37
	bio-rcyApoC3	12.5-0.8	9.2	2.28	1130	0.25	8.1
29F10	bio-nhuApoC3		n/a				
	bio-rcyApoC3	50-0.8	2.2	3.88	531	1.75	31

センサーグラムは、ブランクチャンネルを差し引き、分析物なしのブランクアッセイに対して二重参照された;n/a:適用なし;検出の限界を下回る kd:1E-06 1/s;NS:登録された結合曲線なし

【 0 2 0 6 】

【表 9】

表9.捕捉された抗原として29A6-Nhanceを使用したアッセイに関するSPR結果

mAb	分析物の濃度	KD(pH 7.4 、pM) ヒト apoC-III	ka ヒト	kd ヒト	KD(pH 7.4 、pM) カニクイザル apoC-III	ka (カニクイザル)	kd (カニクイザル)	Rmax(RU) カニクイザル apoC-III pH7.4	Rmax(RU) カニクイザル apoC3 pH5.5
mAb 29A6-Nhance	0.78-25nM	23 ± 24	7.7E+05	4.38E-05	675 ± 71	2.49E+05	1.67E-04	1240	880

【 0 2 0 7 】

3.3 捕捉された抗体を使用したSPR

逆アッセイ手法を使用して、ヤギ抗ヒトIgG Fcγ特異的抗体(Jackson ImmunoResearch社 #109-005-098)を、CM5チップ(GE Healthcare社 #BR100012)に固定した。固定を、NHS/EDCキット(Biacore AB社)において、Biacoreによって提供された方法に従って実施した。簡潔には、チップの活性化後、pH5.0を有する10mM酢酸バ

ッファー中30 µg/mlの抗ヒトFcγ抗体の溶液を、表面密度がおよそ10,000RUに達するまで注入した。次いで、HBS-EPバッファー(GE社 #BR-1008-26;0.010M HEPE S、0.150M NaCl、3mM EDTA、0.05%(v/v) surfactant P20、pH7.4)中50nMの抗体を注入し、最高800RUまでの密度で高アフィニティー抗huFcγ抗体によって捕捉した。抗体捕捉後、100 µlのHBS-EPバッファーを注入し、30 µl/分でフローセルを通過させた。標的に結合させるために、HBS-EPバッファー中60 µlの400nM、200nM、100nM、又は50nMのApoC3タンパク質を注入した。オフレート洗浄を30 µl/分で5分間HBS-EPバッファーのインジェクションによって実施した。解離後、20 µlのpH 1.5の10mMグリシンを注入することによって、フローセル表面を再生した。

【0208】

結果として生じたセンサーグラムを、ラングミュア1:1結合モデルを使用したBIAevaluation 4.1ソフトウェアを用いて分析して、結合反応速度を導き出した。データをゼロ調整し、参照セルセンサーグラムを差し引いた。nhuApoC3及びrcyApoC3注入に相当するセンサーグラムを二重参照するために、分析物なしのブランクアッセイを使用した。解離及び会合相センサーグラムを、4つの異なる濃度曲線に対して別個にフィットさせた。最大RU値が検出の限界を下回る場合(すなわち、<5RU)、センサーグラムをフィッティングから除外した。試験したIgGクローンに対する算出された速度論的パラメーターの概説は、Table 10(表10)に提示されている。SPRシグナルは、試験したmAbのすべてに対する速度論的パラメーターを算出するには低すぎた。しかしながら、固定された抗原及び捕捉された抗原手法に関して観察されたように、クローンのほとんどは、ヒトApoC3に対する高いアフィニティー及び低いオフレート値を有した。加えて、カニクイザルApoC3への特異的結合は、試験した軽鎖IgGクローンのいくつかに関して観察された。

【0209】

10

20

30

40

50

【表 10 A】

表10.捕捉された抗体を使用したアッセイに関するSPR結果

IgG クローン ID	標的	標的の濃度 (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	Rmax (RU)
5E5 WT	nhuApoC3	50	1.64E+05	1.14E-04	0.695	75.2
		100	1.65E+05	1.21E-04	0.734	75.2
		200	1.66E+05	1.28E-04	0.770	68.9
		400	1.65E+05	1.22E-04	0.741	59.5
29B03	nhuApoC3	50		n/a		
		100	2.38E+05	8.00E-05	0.336	38.7
		200	2.41E+05	8.44E-05	0.350	36.6
		400	2.15E+05	8.63E-05	0.401	33.4
	rcyApoC3	50	6.68E+04	0.0127	190	28
		100	3.63E+04	0.014	385	52.9
		200	4.61E+04	0.0137	297	42.3
		400	3.96E+04	0.0145	367	47.5
29A06	nhuApoC3	50	4.16E+05	3.14E-04	0.755	48.8
		100	3.90E+05	3.17E-04	0.814	45.6
		200	3.51E+05	3.20E-04	0.910	42.8
		400	3.36E+05	3.27E-04	0.973	35.8
	rcyApoC3	50				n/a
		100				n/a
		200				n/a
		400	2.25E+04	0.0207	919	75.5
29A05	nhuApoC3	50	2.10E+05	1.26E-03	6.01	45.5
		100	2.06E+05	1.32E-03	6.42	43.5
		200	1.94E+05	1.33E-03	6.87	42.2
		400	1.81E+05	1.33E-03	7.36	39.6
	rcyApoC3	50				n/a
		100	3.00E+04	8.87E-03	296	32.3
		200	2.44E+04	8.75E-03	359	40.1
		400	2.69E+04	9.83E-03	365	57.1
29G02	nhuApoC3	50	3.11E+05	7.18E-04	2.31	97.8
		100	3.01E+05	7.58E-04	2.52	102
		200	2.86E+05	7.33E-04	2.57	103
		400	2.47E+05	7.52E-04	3.04	107
	rcyApoC3	50				n/a
		100				n/a
		200				n/a
		400				n/a

10

20

30

40

【 0 2 1 0 】

50

【表 10B】

29G11	nhuApoC3	50	2.40E+05	1.15E-03	4.79	106
		100	2.41E+05	1.17E-03	4.85	107
		200	2.34E+05	1.22E-03	5.21	109
		400	2.07E+05	1.19E-03	5.76	117
	rcyApoC3	50				n/a
		100				n/a
		200				n/a
		400				n/a
29F10	nhuApoC3	50	1.44E+05	2.46E-04	1.71	83.6
		100	1.34E+05	2.19E-04	1.63	86.7
		200	1.33E+05	2.17E-04	1.63	89.2
		400	1.22E+05	2.19E-04	1.80	93.2
	rcyApoC3	50				n/a
		100				n/a
		200				n/a
		400				n/a

センサーグラムは、ブランクチャンネルを差し引き、分析物なしのブランクアッセイに対して二重参照された;n/a:適用なし

【0211】

(実施例4)

AAV8-huApoC3マウスモデルにおける抗ApoC3抗体29A06の薬物動態及び薬力学
本実施例は、ヒトApoC3のトランスジェニック発現するに起因して損なわれたトリグリセリドクリアランスを有するマウスモデルにおける、抗ApoC3抗体29A06のインビボ特徴付けを記載する。

【0212】

4.1 マウスモデルの作出

20～25gの重量がある40匹の63日齢の雄C57Bl6マウスを、12時間の日中/夜間サイクルを有して、トウモロコシ穂軸寝床にてケージあたり5匹で飼育した。マウスに標準的な齧歯類食を給餌し、自由裁量での水を許した。ヒトApoC3の過剰発現のために、マウスに、肝臓特異的チロキシン結合グロブリン(TBG)プロモーターの下でヒトApoC3を発現する血清型8アデノ随伴ウイルスベクターの250μL(3.5×10¹¹ゲノムコピー)を腹腔内に注射した。ベクターは、Penn Vector Core(ペンシルベニア大学の遺伝子療法プログラム)から獲得された。投与の14日後、ヒトApoC3のレベルに基づいてマウスを6の群に割り当てた。マウスから後眼窩洞を介して血を抜き取って、t=0の投薬前ApoC3レベルを確立した。次いで、マウスに、30mg/kgのHyhel5対照抗体、30mg/kgの生殖細胞系列前のpH依存性5E5VH5_VL8抗体(PCT/IB2018/052780に記載される)、又は10、25、若しくは50mg/kgの29A06試験抗体の皮下注射を直ちに与えた。マウスから後眼窩洞を介して血を抜き取って、80μLの0.125% EDTA生理食塩水中に25μLの全血のサンプルを獲得した。サンプルを使用して、投薬後0時間、8時間、1日、及び2日の時点で、ヒトApoC3、マウスApoC3、トリグリセリド、及び29A06抗体のレベルを分析した。

【0213】

4.2 抗ApoC3抗体29A06の薬力学

ヒトApoC3 ELISA

96ウェルプレート(Greiner社 #655061)に、PBS中50μLの0.8μg/mLのApoC3

一次抗体(Abcam社ウサギポリクローナル抗ヒトApoC3 #ab21032)をコートし、4℃で一晩インキュベートした。次いで、プレートを200 μL TBS-T(0.1% Tween-20)で4回洗浄し、200 μL PBS/クリアミルク/BSAブロッキングバッファー(PBS中、Pierce社クリアミルクブロッカー#37587、それに加えて3% Roche社BSAフラクションV、プロテアーゼ不含#03117332001、又はCell Sciences社天然BSAコーンフラクションV #CSI14635)を用いて30℃で90分間ブロッキングした。ブロッキングバッファーを除去し、ブロッキングバッファー中1:1200希釈した50 μLの試験サンプルを添加した。プレートを300rpmで混合しながら室温で2時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを200 μL TBS-Tで4回洗浄した。次いで、ブロッキングバッファー中50 μLの0.10 μg/mL二次抗体(Abcam社ヤギポリクローナルビオチンコンジュゲートApoC3 #ab21024)を添加し、プレートを300rpmで混合しながら室温で1時間インキュベートした。プレートをTBS-Tで1回洗浄し、PBSに100倍希釈した50 μL SA-HRP(Abcam社 #34028)を添加し、プレートを300rpmで混合しながら室温で30分間インキュベートした。次いで、プレートを200 μL TBS-Tで4回洗浄し、80 μL TMB(Thermo社Ultra-TMB ELISA #34028)で発色させ、発色を50 μL 0.5N HClで終結させた。分光光度計(SpectraMax M5、Molecular Devices社)を使用して、検出を450nmで実施した。サンプル中のApoC3の量を、ヒト血漿由来の精製されたApoC3(Athens Research and Technology社)を使用して構築された標準曲線の4パラメーターフィット(SoftMax Proソフトウェア、Molecular Devices社)から算出した。

10

20

【0214】

図1A及び図1Bに示されるように、29A06抗体の投与は、マウスにおいてヒトApoC3の用量依存的低下をもたらした。10、25、及び50mg/kgの抗体用量に対して、それぞれおよそ25、50、及び75%の最大低下が12時間以内に観察された。pH依存的5E5VH5_VL8抗体と比較した場合、29A06は、作用のより短い持続時間を有した。例えば、25mg/kg 29A06で処理されたマウスは、投薬後2日までに低下した効力を有し、一方で30mg/kg用量の5E5VH5_VL8は、ApoC3レベルを低下させ続けた。

【0215】

マウスApoC3 ELISA

ELISA法は、以下の修正を有して、本実施例において上で記載されるように従った:ApoC3一次抗体(Santa Cruz Biotechnology社ウサギポリクローナル抗ApoC3 #SC50378)を0.5 μg/mLで使用し、試験サンプルを1:100希釈し、二次抗体(Abcam社ヤギポリクローナルビオチンコンジュゲートApoC3 #ab21024)を0.6 μg/mLで使用した。サンプル中のマウスApoC3の量を、組み換えマウスApoC3(Blue Sky Bioservices社)を使用して構築された標準曲線の4パラメーターフィット(SoftMax Proソフトウェア、Molecular Devices社)から算出した。

30

【0216】

図2に示されるように、ヒト及びカニクイザルに結合する29A06抗体は、マウスApoC3タンパク質の用量依存的低下をもたらした。マウスApoC3レベルは、10、25、及び50mg/kg 29A06の用量に対して、投薬後8時間までに、それぞれ16、24、及び49%減少した。レベルは、投薬後24時間の時点でそれぞれ15、36、及び40%なおも低下し、投薬後2日の時点で10~24%低下したままであった。

40

【0217】

血漿トリグリセリドアッセイ

透明の96ウェルプレート(Corning社Costar #9017)中で、10 μLの希釈した血漿と180 μLのThermo Scientific(商標)トリグリセリド試薬(#TR22421)とをインキュベートすることによって、トリグリセリドを分析した。37℃で10分後、プレートをSpectramax M2(Molecular Devices社)にて540nmで読み取り、濃度をグリセロール標準曲線の線形フィット(SoftMax Pro、Molecular Devices社)から算出した。

【0218】

図3A及び図3Bに示されるように、血漿トリグリセリドレベルは、29A06抗体処理の後

50

に低下した。投薬後8時間の時点で、トリグリセリドレベルは、10、25、及び50mg/kgの29A06の用量に対して、それぞれ63、18、及び71%低下した。50mg/kg用量の29A06に関して観察されたトリグリセリドレベルの71%の低下は、およそ150mg/dLの減少に相当した。30mg/kgのHyhel5対照抗体で処理されたマウスは、投薬後8時間の時点で、トリグリセリドレベルのおよそ34%の低下を経験した。しかしながら、レベルは、投薬後24時間までにベースラインに戻った。VH5VL8は、投薬後8~24時間にトリグリセリドレベルをおよそ22%減少させたが、レベルは、投薬後2日までにベースラインに戻った。

【0219】

4.3 抗ApoC3抗体29A06の薬物動態

ELISA法は、以下の修正を有して、本実施例において上で記載されるように従った:IgG一次抗体(Fitzgerald社ヤギ抗ヒトIgG Fcポリクローナル#41-XG57)を2.0µg/mLで使用し、試験サンプルを1:1200希釈し、二次抗体(Abcam社ヤギ抗ヒトIgG-Fc(ビオチン)ポリクローナル#ab97223)を0.05µg/mLで使用した。サンプル中のIgGの量を、精製された試験抗体を使用して構築された標準曲線の4パラメーターフィット(SoftMax Pro、Molecular Devices社)から算出した。図4に示されるように、血漿IgGレベルは増加し、投薬後8時間前後でピークに達し、その後減少した。

【0220】

(実施例5)

カニクイザルモデルにおける抗ApoC3抗体29A06-Nhanceの薬物動態及び薬力学

本実施例は、カニクイザルモデルにおける抗ApoC3抗体29A06-Nhanceのインビボ特徴付けを記載する。29A06-Nhance抗体は、配列番号38に記載される重鎖アミノ酸配列及び配列番号50に記載される軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0221】

5匹の3~4kgの非ナীব雄カニクイザル(マカカ・ファシキュラリス)が本調査に含まれ、小分子を以前に投薬されたことがあり得る。2匹の動物を、処理前の循環ApoC3のレベルを判定するだけのために使用した。動物をそれらの元のケージ仲間又は群と滞在させ、自動給水システムを有するステンレス鋼ケージで飼育した(最高3匹/性別/群/ケージ)。Charles River社の調査責任者及び/又は現場獣医によって不適当であると見なされない限り、飼育条件を維持した。指定の手順の間、動物を分離した。調査完了後、すべての動物を、適切な洗い流し及び回復期間の後、将来的な使用のために試験施設コロニーに戻した。動物に、PMI Nutrition International社保証の霊長類食第5048号を1日2回給餌した。臨床兆候又は他の変化によって当然とされる動物に補助的食事を提供した。調査の際、前日の午後7時までに食料の取り出しをして、動物を一晩絶食させた。調査前の回収を含めたすべての血液回収の前に、絶食を10~12時間維持し、次いで朝食に戻した。試験施設の標準作業手順書によって、夕食を提供した。調査前の血液回収の前、並びに1日目、8日目、及び22日目の29A06-Nhance抗体を用いた投薬前に、体重を計測し及び記録した。Table 11(表11)に示されるように、投薬を投与した。

【0222】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表11.29A06-Nhance抗体を用いたカニクイザル投薬

群	調査前 の血液 回収 [^]	投薬日	雄 の 数	試験化合 物	用量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	用量体 積 (mL/kg)	経 路	ビヒ クル	洗い 流し
1	-5~-10 日目	1、8、 及び 22 日目	3	29A06- NHANCE	50	40	1.25	IV	PBS	3mL 生理 食塩 水
3*	-5~-10 日目	NA	2*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*調査前の血液回収のみのため、[^]1回の回収のみ

10

【0 2 2 3】

静脈内投薬に使用されない末梢静脈からすべての血液サンプルを回収した。およそ1mLの全血を各時点で回収した:調査前、投薬後0、24、48、72、96、120、144、及び168時間。全血サンプルを、少なくとも30分間及び60分間よりも長くなく、室温で保管した。血清を、回収の75分以内に凍結し、分析まで-80℃で保管した。

20

【0 2 2 4】

5.1 抗ApoC3抗体29A06-Nhanceの薬力学

カニクイザルApoC3 ELISA

ELISA法は、以下の修正を有して、実施例4に記載されるように従った:ApoC3一次抗体(社内の抗ヒト、カニクイザル結合性;クラス14C07)を1.5 µg/mLで使用し、試験サンプルを1:15000希釈し、二次抗体(Abcam社ヤギポリクローナルビオチンコンジュゲートApoC3 #ab21024)を0.25 µg/mLで使用した。サンプル中のApoC3の量を、組み換えカニクイザルApoC3(Blue Sky Bioservices社)を使用して構築された標準曲線の4パラメーターフィット(SoftMax Pro、Molecular Devices社)から算出した。

30

【0 2 2 5】

図5A及び図5Bに示されるように、ApoC3の血清レベルは、29A06-Nhanceの投与後に低下した。44%の低下は、1回目の投薬の24時間後に観察された。しかしながら、ApoC3レベルは、投薬後5~6日目の間に投薬前のレベルに戻った。8日目の2回目の投薬の投与後、ApoC3の血清レベルは、投薬後24時間の時点で72%低下した。再び、ApoC3レベルは、投薬後5日間でベースラインに戻った。同様に、22日目の3回目の投薬後、血清ApoC3レベルは、投薬後24時間で55%低下し、レベルは、投薬後3~4日目の間にベースラインに戻った。

【0 2 2 6】

カニクイザルApoB ELISA

ELISA法は、以下の修正を有して、実施例4に記載されるように従った:ApoB一次抗体(Meridian Life Sciences社ヤギポリクローナル抗ヒトApoB #K45253G)を2.0 µg/mLで使用し、試験サンプルを1:2000希釈し、二次抗体(Meridian Life Sciences社ヤギポリクローナルビオチンコンジュゲートApoB 48/100 #34003G)を0.75 µg/mLで使用した。サンプル中のマウスApoBの量を、マウスVLDL(OptiPrep方法論を使用して社内で調製された)を使用して構築された標準曲線の4パラメーターフィット(SoftMax Proソフトウェア、Molecular Devices社)から算出し、ApoBは総VLDL重量の20%であると推測した。図6に示されるように、血清ApoBレベルは、それらのベースラインである投薬前の値から変化がなかった。

40

【0 2 2 7】

50

血漿トリグリセリドアッセイ

方法は、実施例4に記載されるように従った。図7A及び図7Bに示されるように、血清トリグリセリドレベルは、投与後24～48時間で、3回の投薬のそれぞれに対してそれぞれ52、40、及び33%減少した。しかしながら、これらの変化は、この限定された数の動物における可変的な投薬前レベルにおそらく起因して、有意ではなかった。

【0228】

5.2 抗ApoC3抗体29A06-Nhanceの薬物動態

ELISA法は、以下の修正を有して、実施例3に記載されるように従った:IgG一次抗体(Abcam社Ab99771、マウスモノクローナル4E3抗ヒトIgG1ヒンジ重鎖)を $1.5\mu\text{g/mL}$ で使用し、試験サンプルを1:9000希釈し、二次抗体(Abcam社ヤギF(ab')₂抗ヒトIgG-Fc(HRP)、血清吸着処理済み(pre-adsorbed)(ab98595))を $0.1\mu\text{g/mL}$ で使用した。サンプル中のIgGの量を、精製された試験抗体を使用して構築された標準曲線の4パラメーターフィット(SoftMax Pro、Molecular Devices社)から算出した。

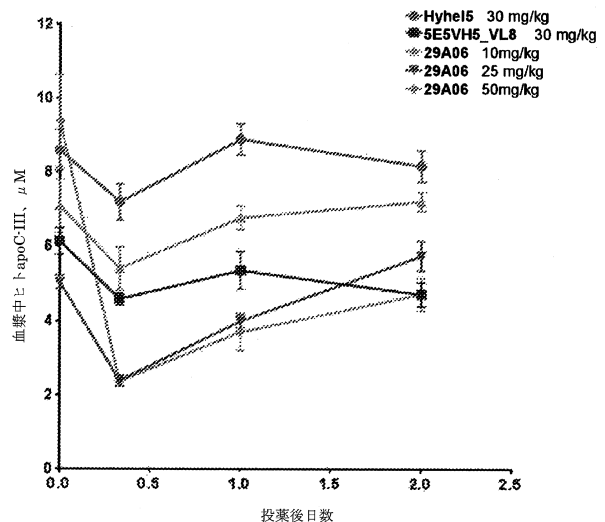
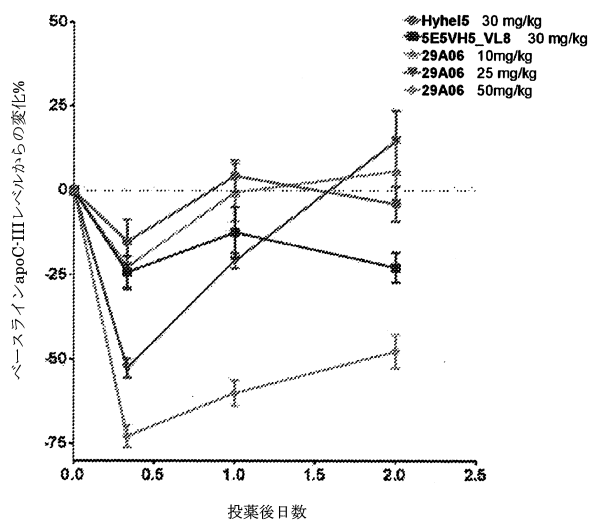
【0229】

29A06-Nhance IgGの血清レベルは、1回目の投薬後24時間の時点で $473\mu\text{g/mL}$ であった。図8に示されるように、レベルは、投薬後6日まで $100\mu\text{g/mL}$ 前後にとどまり、その後 $71\mu\text{g/mL}$ 前後に下降した。8日目の投薬2の後、血清レベルは、投薬後24時間の時点で $291\mu\text{g/mL}$ であった。レベルは、投薬後7日間 $100\mu\text{g/mL}$ を上回ったままであった。同様に、22日目の投薬3の24時間後、血清IgGレベルは $456\mu\text{g/mL}$ であり、レベルは $100\mu\text{g/mL}$ 前後で維持された。

【図面】

【図1A】

【図1B】



10

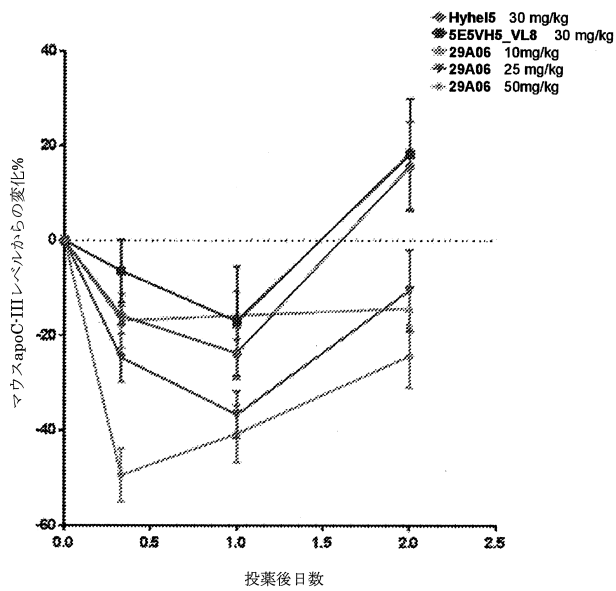
20

30

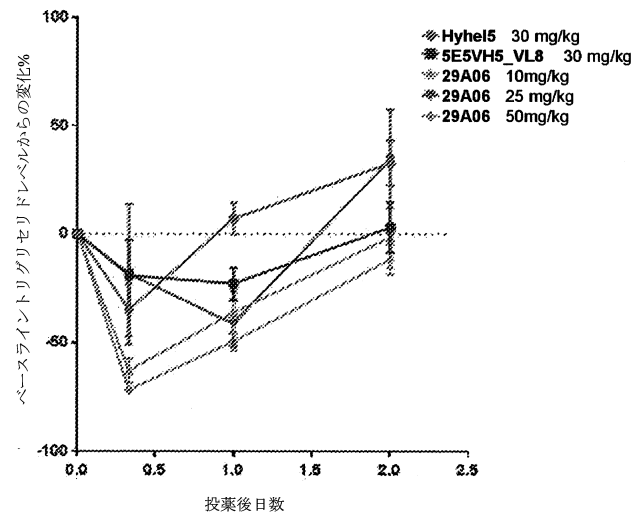
40

50

【図 2】



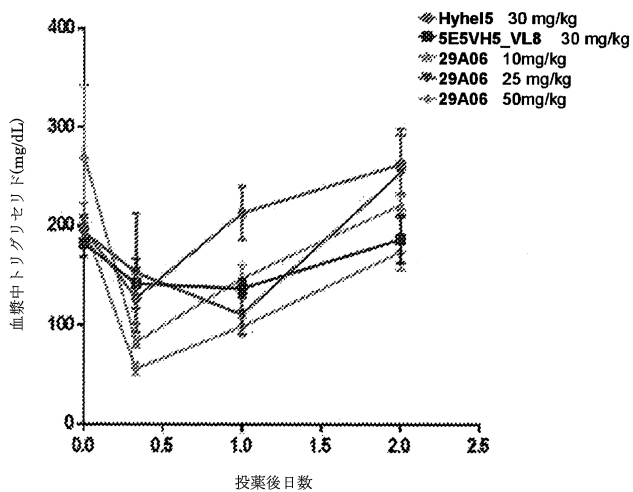
【図 3 A】



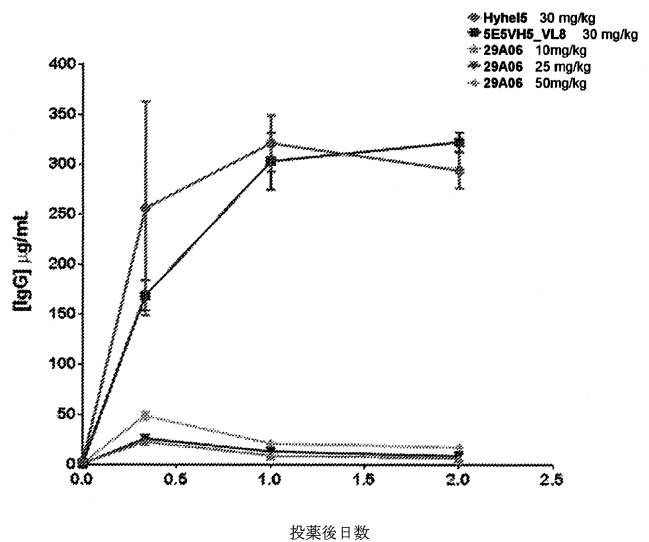
10

20

【図 3 B】



【図 4】

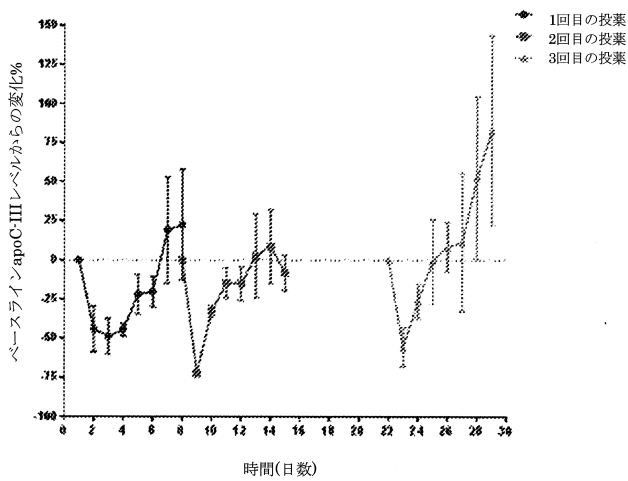


30

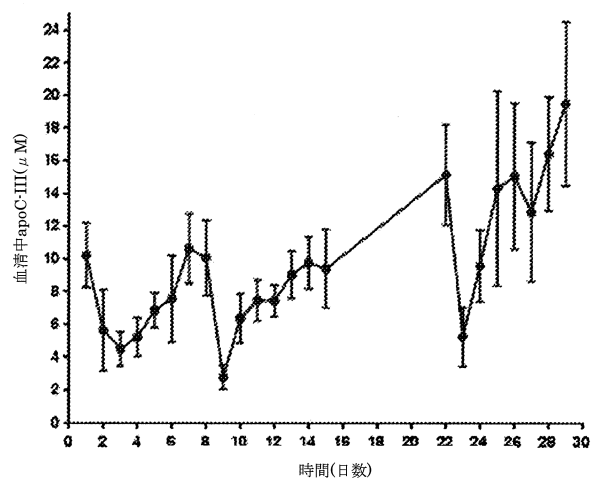
40

50

【図 5 A】

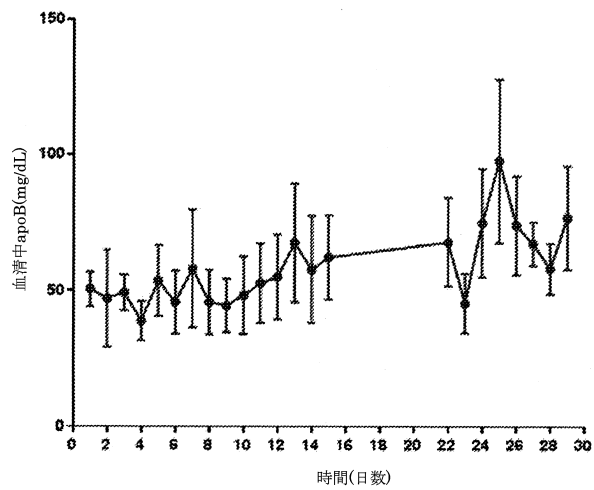


【図 5 B】

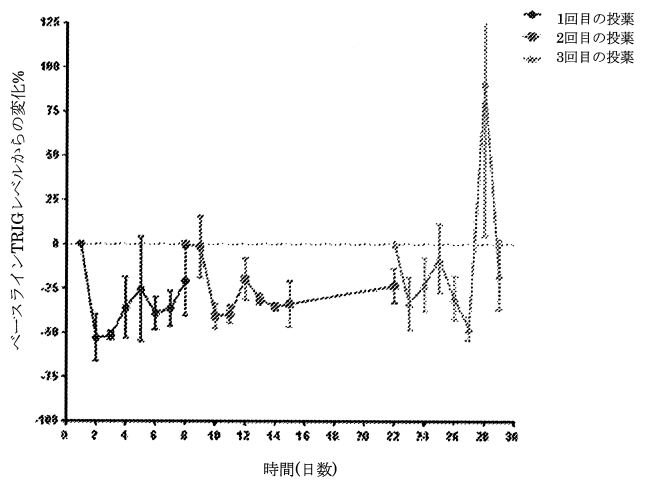


10

【図 6】



【図 7 A】



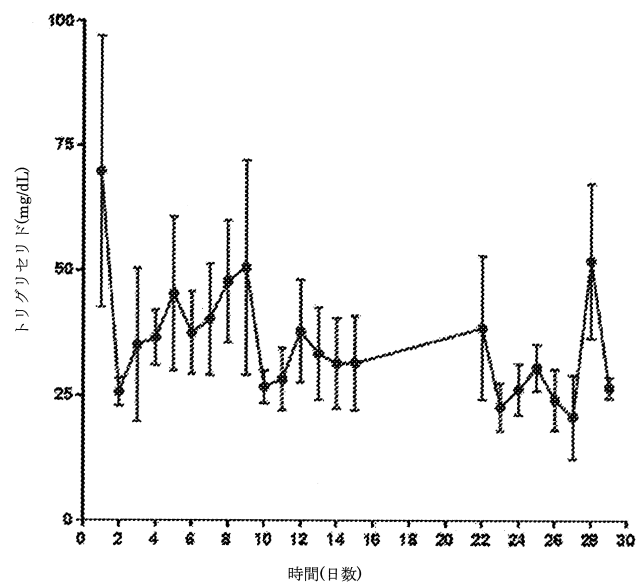
20

30

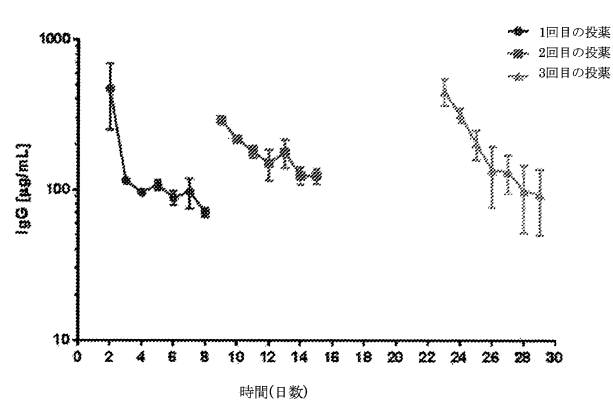
40

50

【図 7 B】



【図 8】



【配列表】

2022504287000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/058403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P3/06 C07K16/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/007999 A1 (STATEN BIOTECHNOLOGY B V [NL]) 11 January 2018 (2018-01-11) claims 34-64; examples 6,7; tables 1,2 -----	1-4,11, 13-18, 21-49
X	WO 2014/131008 A1 (INTRINSIC METABIO SOLUTIONS LLC [US]) 28 August 2014 (2014-08-28) claim 3; examples 1,2 -----	1-4,11, 13-18, 21-49
A	WO 2004/081046 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BIOINVENT INTERNAT A B [SE] ET AL.) 23 September 2004 (2004-09-23) page 5, line 5 - line 16 page 15, line 13 - line 25 -----	1-4,11, 13-18, 21-49
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 January 2020		25/03/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Saame, Tina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/058403

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4(completely); 11, 13-18, 21-49(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ IB2019/ 058403

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4(completely); 11, 13-18, 21-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, wherein the antibody specifically binds to an epitope within the amino acid sequence FSEFWDLDP (SEQ ID NO: 3).

2. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR regions of exemplified antibody 29B03 (SEQ ID Nos 5-7, 8, 14 and 19 respectively)

3. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR regions of exemplified antibody 29A06 (SEQ ID Nos 5-7,9, 15 and 19 respectively)

4. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR regions of exemplified antibody 29A05 (SEQ ID Nos 5-7, 10, 14 and 19 respectively)

5. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/ 1B2019/ 058403

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

regions of exemplified antibody 29G02 (SEQ ID Nos 5-7, 11, 16 and 20 respectively)

6. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR regions of exemplified antibody 30D10 (SEQ ID Nos 5-7, 12, 17 and 21 respectively)

7. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR regions of exemplified antibody 29F10 (SEQ ID Nos 5-7, 13, 15, 19 respectively)

8. claims: 5-49(partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises the six CDR regions of exemplified antibody 29G11 (SEQ ID Nos 5-7, 10, 18 and 20 respectively)

9. claims: 5, 6, 11, 13-18, 21-49(all partially)

An isolated antibody that specifically binds to human and cynomologus monkey ApoC3, comprising a heavy chain variable region comprising complementarity determining regions CDRH1, CDRH2 and CDRH3, and a light chain variable region comprising complementarity determining regions CDRL1, CDRL2 and CDRL3, wherein the antibody comprises a combination of six CDR regions comprised within the scope of independent claim 5 which is not covered by inventions 2-8

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/058403

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018007999 A1	11-01-2018	AU 2017292184 A1 CA 3030099 A1 CN 109689685 A EP 3481864 A1 JP 2019525772 A KR 20190039937 A US 2019241648 A1 WO 2018007999 A1	07-02-2019 11-01-2018 26-04-2019 15-05-2019 12-09-2019 16-04-2019 08-08-2019 11-01-2018
WO 2014131008 A1	28-08-2014	AU 2014218583 A1 CA 2902491 A1 EP 2958628 A1 US 2016009792 A1 WO 2014131008 A1	15-10-2015 28-08-2014 30-12-2015 14-01-2016 28-08-2014
WO 2004081046 A2	23-09-2004	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 3/06 (2006.01)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/40 (2006.01)
A 6 1 K 31/404 (2006.01)
A 6 1 K 31/505 (2006.01)
A 6 1 K 31/47 (2006.01)
A 6 1 K 31/366 (2006.01)
A 6 1 K 31/397 (2006.01)
A 6 1 K 31/22 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 3/06
A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 31/40
A 6 1 K 31/404
A 6 1 K 31/505
A 6 1 K 31/47
A 6 1 K 31/366
A 6 1 K 31/397
A 6 1 K 31/22

4 C 2 0 6
 4 H 0 4 5

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
 G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
 I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

ド・ 1 6 0

(72)発明者 ハンス・デ・ハールト

オランダ・ N L - 4 4 3 6 N A ・ アウデランデ・ヘト・ズウィント・ 1

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA06
 4B065 AA91X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA19 AA22 AA23 NA05 ZC202 ZC332
 4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE01
 4C086 AA01 BA17 BC02 BC05 BC13 BC28 BC42 MA02 MA04 NA05
 ZC20 ZC33
 4C206 AA01 DB02 DB56 KA04 MA02 MA04 NA05 ZC20 ZC33
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA23 EA27 FA74 GA26