



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0039937
(43) 공개일자 2019년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7002789

(22) 출원일자(국제) 2017년07월07일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2019년01월28일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2017/054125

(87) 국제공개번호 WO 2018/007999

국제공개일자 2018년01월11일

(30) 우선권주장

62/360,084 2016년07월08일 미국(US)

62/491,591 2017년04월28일 미국(US)

(71) 출원인
스태튼 바이오테크놀로지 비.브이.
네덜란드, 6534 에이티 네이메겐, 트랜시스토르웨
그 5제이

(72) 발명자
다실바-자딘 폴
미국, 코네티컷 06437, 길포드, 160 샘 힐 로드
드 하드 한스

네덜란드, 엔엘-4436엔에이 우드랜데, '티 지원트
1

랜드로 제임스 에이.
미국, 코네티컷 06410, 채셔, 412 메이플 에비뉴

(74) 대리인
손민

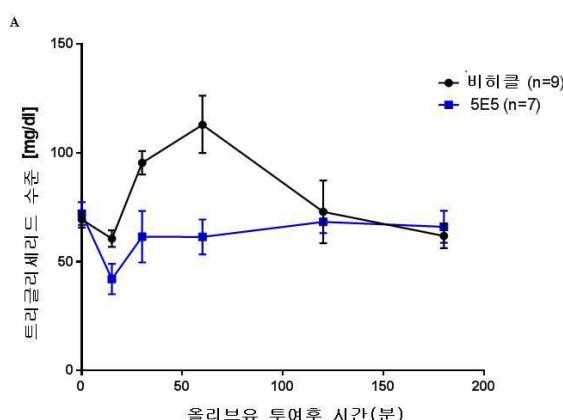
전체 청구항 수 : 총 64 항

(54) 발명의 명칭 항-ApoC3 항체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고 ApoC3 기능을 길항시키는 항체를 제공한다. 또한, 이들 항체를 포함하는 약제학적 조성물, 이들 항체를 코딩하는 핵산, 이들 항체를 제조하기 위한 발현 벡터 및 숙주 세포, 및 이들 항체를 사용하여 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도9a



(52) CPC특허분류

A61P 3/06 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
C07K 2317/22 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

ApoC3에 특이적으로 결합하고, 초저밀도 지질단백질(VLDL)의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠(attenuating)시키는, 단리된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 혈액으로부터 ApoB의 제거(clearance) 속도(rate)를 증가시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 혈액중 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 VLDL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키는, 단리된 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시키는, 단리된 항체.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있는, 단리된 항체.

청구항 8

ApoC3에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서,

상기 항체가 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열[GWVTDGSSLK] 내의 에피토프에 결합하는, 단리된 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 하나의 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 2의 위치 4 및 9에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 2의 위치 4, 6 및 9에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 2의 위치 1, 4, 6 및 9에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 및 10에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 14

제8항 내지 제13항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 VLDL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키는, 단리된 항체.

청구항 15

제8항 내지 제14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시키는, 단리된 항체.

청구항 16

ApoC3에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서,

상기 항체가 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열[FSEFWLDPE] 내의 에피토프에 결합하는, 단리된 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 3의 위치 2, 5, 6, 8 또는 10에 적어도 하나의 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 3의 위치 5 및 6에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 3의 위치 2, 5, 6 및 8에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 3의 위치 10에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 3의 위치 6, 8 및 10에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 22

제16항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 3의 위치 6 및 8에 아미노산을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 23

제16항 내지 제22항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있는, 단리된 항체.

청구항 24

제16항 내지 제23항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 초저밀도 지질단백질(VLDL)의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키는, 단리된 항체.

청구항 25

제16항 내지 제24항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 26

제16항 내지 제25항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 혈액으로부터 ApoB의 제거 속도를 증가 시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 27

제16항 내지 제26항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 혈액중 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 28

ApoC3에 특이적으로 결합하고, 상보성 결정 영역 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 갖는 중쇄 가변 영역 및, 상보성 결정 영역 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체로서,

상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3이 각각 서열번호 4, 5, 6, 73, 74 및 75; 7, 8, 9, 76, 77 및 78; 10, 11, 12, 79, 80 및 81; 13, 14, 15, 82, 83 및 84; 16, 17, 18, 85, 86 및 87; 19, 20, 21, 88, 83 및 89; 22, 23, 24, 90, 91 및 92; 25, 26, 27, 82, 93 및 94; 28, 29, 30, 95, 96 및 97; 16, 31, 32, 98, 99 및 100; 33, 34, 35, 101, 99 및 102; 25, 36, 37, 103, 104 및 105; 38, 39, 40, 82, 106 및 107; 41, 42, 43, 108, 109 및 110; 7, 8, 9, 111, 83 및 113; 47, 48, 49, 82, 114 및 115; 50, 51, 52, 116, 117 및 118; 53, 54, 55, 119, 120 및 121; 56, 57, 58, 122, 123 및 124; 59, 60, 61, 125, 83 및 126; 62, 63, 64, 127, 128 및 129; 65, 66, 67, 82, 114 및 130; 68, 69, 70, 131, 132 및 133; 또는 68, 71, 72, 124, 135 및 136에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 29

ApoC3에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서,

상기 항체가 서열번호 137 내지 160으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 30

ApoC3에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서,

상기 항체가 서열번호 161 내지 183 및 151로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 31

ApoC3에 특이적으로 결합하는 단리된 항체로서,

상기 항체가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고,

상기 중쇄 가변 영역 및 상기 경쇄 가변 영역이 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및 183 또는 160 및 151에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항체.

청구항 32

ApoC3에 결합하기 위해 제28항 내지 제31항 중의 어느 한 항의 항체와 경쟁하는, 단리된 항체.

청구항 33

제28항 내지 제31항 중의 어느 한 항의 항체와 동일한 ApoC3 애피토프에 결합하는, 단리된 항체.

청구항 34

제8항 내지 제33항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 초저밀도 지질단백질(VLDL)의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감소시키는, 단리된 항체.

청구항 35

제8항 내지 제34항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 36

제8항 내지 제35항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 혈액으로부터 ApoB의 제거 속도를 증가시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 37

제8항 내지 제36항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체에서 혈액 중 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있는, 단리된 항체.

청구항 38

제8항 내지 제37항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 VLDL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키는, 단리된 항체.

청구항 39

제8항 내지 제38항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시키는, 단리된 항체.

청구항 40

제8항 내지 제38항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있는, 단리된 항체.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중의 어느 한 항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는(encoding) 폴리뉴클레오티드.

청구항 43

제42항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 44

제43항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 45

ApoC3에 결합하는 항체를 생성하는 방법으로서,

상기 방법이 항체의 발현을 가능하게 하는 조건하에서 제44항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 46

대상체의 혈액에서 ApoC3의 활성을 억제시키는 방법으로서,

상기 방법이 제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 47

대상체의 혈액중 트리글리세리드 수준을 감소시키는 방법으로서,

상기 방법이 제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 48

대상체에서 식후 고지혈증을 억제하는 방법으로서,

상기 방법이 제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 49

대상체에서 고트리글리세리드혈증을 치료하는 방법으로서,

상기 방법이 제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 50

대상체에서 카이로미크론혈증을 치료하는 방법으로서,

상기 방법이 제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 51

고트리글리세리드혈증을 갖는 대상체에서 심혈관 질환의 위험을 감소시키는 방법으로서,

상기 방법이 제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항의 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 심혈관 질환이 심근 경색인, 방법.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 심혈관 질환이 협심증인, 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, 상기 심혈관 질환이 뇌졸중인, 방법.

청구항 55

제51항에 있어서, 상기 심혈관 질환이 아테롬성 동맥경화증인, 방법.

청구항 56

제46항 내지 제55항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 대상체의 혈액에서 카이로미크론(chylomicron) 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시키는, 방법.

청구항 57

제46항 내지 제56항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 추가의 지질 저하제를 제공받는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 추가의 지질 저하제가 HMG-CoA 리덕타제 억제제인, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 HMG-CoA 리덕타제 억제제가 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴 또는 심바스타틴인, 방법.

청구항 60

제57항에 있어서, 상기 추가의 지질 저하제가 PCSK9 억제제인, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 PCSK9 억제제가 알리로쿠맙, 에볼로쿠맙 또는 보코시주맙인, 방법.

청구항 62

제57항에 있어서, 상기 추가의 지질 저하제가 에제티미브인, 방법.

청구항 63

제57항에 있어서, 상기 추가의 지질 저하제가 에제티미브 및 HMG-CoA 리덕타제 억제제의 조합인, 방법.

청구항 64

제57항에 있어서, 상기 추가의 지질 저하제가 에제티미브, HMG-CoA 리덕타제 억제제 및 PCSK9 억제제의 조합인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2016년 7월 8일자로 제출된 미국 특허출원 제62/360,084호 및 2017년 4월 28일자로 제출된 제62/491,591호의 이익을 주장하고, 이들 각각은 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.

[0003]

분야

[0004]

본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 항체 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

상승된 혈액 트리글리세리드 수준(고트리글리세리드혈증)은 아테롬성 동맥경화증에 대한 원인 인자이고, 심혈관 사상, 예를 들면, 심혈관 사망, 협심증, 심근 경색 및 뇌졸중의 위험을 증가시킨다.

[0006]

ApoC3은, 혈액에서 매우 높은 농도($10 \mu M$ 초과)에서 순환하고 주로 트리글리세리드 풍부 지질단백질(TRL), TRL 잔존물 및 고밀도 지질단백질에 결합되는 단백질이다. ApoC3은 혈액 트리글리세리드 수준의 중요한 조절인자인 것으로 생각된다. 예를 들면, 인간에서 ApoC3 수준은 혈액 트리글리세리드 수준과 양으로 상관하는 것으로 밝혀졌고, 상승된 ApoC3 수준은 고트리글리세리드혈증과 연관된다. 또한, ApoC3은 지질단백질 리파제(TRL에서 트리글리세리드를 가수분해하는 효소)의 활성을 억제하고 또한 TRL 잔존물의 간장 흡수를 억제하는 것으로 밝혀졌고, 이들 둘 다는 혈액 트리글리세리드 수준의 상승을 유발한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

고트리글리세리드혈증의 치료를 위한 몇몇 승인된 치료제(예: 피브레이트, 니아신 및 오메가-3 지방산)이 있다. 그러나, 이들 치료제는 혈장 트리글리세리드의 저하에서만 보통 효과적이다. 따라서, 혈장 트리글리세리드를 저하시키는 개선된 치료제가 당해 기술분야에서 필요하다.

과제의 해결 수단

[0008]

본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고 ApoC3 기능을 억제하는 항체(예: 단리된 항체)를 제공한다. 또한, 이들 항체를 포함하는 약제학적 조성물, 이들 항체를 코딩하는 핵산, 이들 항체를 제조하기 위한 발현 벡터 및 숙주 세포, 및 이들 항체를 사용하여 대상체(subject)를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 간세포에 의한 TRL 흡수를 억제시키는 ApoC3의 능력을 감쇠(attenuating)시킬 수 있다. 따라서, 개시된 항-ApoC3 항체는 고트리글리세리드혈증 및 관련 질환(예: 심혈관 질환 및 췌장염)의 치료 및 예방에 유용하다.

[0009] 따라서, 한 가지 양태에서, 본 발명은, ApoC3에 특이적으로 결합하고, 초저밀도 지질단백질(VLDL)의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키는, 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoB의 제거(clearance) 속도(rate)를 증가시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 혈액중 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 VLDL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있다.

[0010] 몇몇 상이한 타입의 항-ApoC3 항체가 본원에 개시되어 있고, 각각은 ApoC3의 상이한 신규 에피토프에 결합하고 상이한 기능적 특성을 갖는다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열[FSEFWDLDPE] 내의 에피토프에 결합하고, 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있다. 또는, 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열[GWVTDGFSSLK] 내의 에피토프에 결합하고, 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제한다.

[0011] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열[GWVTDGFSSLK] 내의 에피토프에 결합한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 하나의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 2의 위치 4, 6 및 9에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6 및 9에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 및 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 VLDL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시킨다.

[0012] 특정 양태에서, 본 발명은 ApoC3에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열[FSEFWDLDPE] 내의 에피토프에 결합한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5, 6, 8 또는 10에 적어도 하나의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 5 및 6에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5, 6 및 8에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 6, 8 및 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 6 및 8에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 초저밀도 지질단백질(VLDL)의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoB의 제거 속도를 증가시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 혈액중 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3에 특이적으로 결합하고, 상보성 결정 영역 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 갖는 중쇄 가변 영역 및, 상보성 결정 영역 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체를 제공하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 서열번호 4, 5, 6, 73, 74 및 75; 7, 8, 9, 76, 77 및 78; 10, 11, 12, 79, 80 및 81; 13, 14, 15, 82, 83 및 84; 16, 17, 18, 85, 86 및 87; 19, 20, 21, 88, 83 및 89; 22, 23, 24, 90, 91 및 92; 25, 26, 27, 82, 93 및 94; 28, 29, 30, 95, 96 및 97; 16, 31, 32, 98, 99 및 100; 33, 34, 35, 101, 99 및 102; 25, 36, 37, 103, 104 및 105; 38, 39, 40, 82, 106 및 107; 41, 42, 43, 108, 109 및 110; 7, 8, 9, 111, 83 및 113; 47, 48, 49, 82, 114 및 115; 50, 51, 52, 116, 117 및 118; 53, 54, 55, 119, 120 및 121; 56, 57, 58, 122, 123 및 124; 59, 60, 61, 125, 83 및 126; 62, 63, 64, 127, 128 및 129; 65, 66, 67, 82, 114 및 130; 68, 69, 70, 131, 132 및 133; 또는 68, 71, 72, 124, 135 및 136에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열번호 137 내지 160으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 서열번호 161 내지 183 및 151로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3에 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및

183 또는 160 및 151에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3에 결합하기 위해, 상보성 결정 영역 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 갖는 중쇄 가변 영역 및, 상보성 결정 영역 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 항체를 제공하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 서열번호 4, 5, 6, 73, 74 및 75; 7, 8, 9, 76, 77 및 78; 10, 11, 12, 79, 80 및 81; 13, 14, 15, 82, 83 및 84; 16, 17, 18, 85, 86 및 87; 19, 20, 21, 88, 83 및 89; 22, 23, 24, 90, 91 및 92; 25, 26, 27, 82, 93 및 94; 28, 29, 30, 95, 96 및 97; 16, 31, 32, 98, 99 및 100; 33, 34, 35, 101, 99 및 102; 25, 36, 37, 103, 104 및 105; 38, 39, 40, 82, 106 및 107; 41, 42, 43, 108, 109 및 110; 7, 8, 9, 111, 83 및 113; 47, 48, 49, 82, 114 및 115; 50, 51, 52, 116, 117 및 118; 53, 54, 55, 119, 120 및 121; 56, 57, 58, 122, 123 및 124; 59, 60, 61, 125, 83 및 126; 62, 63, 64, 127, 128 및 129; 65, 66, 67, 82, 114 및 130; 68, 69, 70, 131, 132 및 133; or 68, 71, 72, 124, 135 및 136에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0016] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은, ApoC3에 결합하기 위해, 서열번호 137 내지 160으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 항체를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3에 결합하기 위해, 서열번호 161 내지 183 및 151로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 항체를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3에 결합하기 위해, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는, 항체를 제공하고, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및 183, 또는 160 및 151에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 상보성 결정 영역 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 갖는 중쇄 가변 영역 및, 상보성 결정 영역 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 ApoC3 에피토프에 결합하는 항체를 제공하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 서열번호 4, 5, 6, 73, 74 및 75; 7, 8, 9, 76, 77 및 78; 10, 11, 12, 79, 80 및 81; 13, 14, 15, 82, 83 및 84; 16, 17, 18, 85, 86 및 87; 19, 20, 21, 88, 83 및 89; 22, 23, 24, 90, 91 및 92; 25, 26, 27, 82, 93 및 94; 28, 29, 30, 95, 96 및 97; 16, 31, 32, 98, 99 및 100; 33, 34, 35, 101, 99 및 102; 25, 36, 37, 103, 104 및 105; 38, 39, 40, 82, 106 및 107; 41, 42, 43, 108, 109 및 110; 7, 8, 9, 111, 83 및 113; 47, 48, 49, 82, 114 및 115; 50, 51, 52, 116, 117 및 118; 53, 54, 55, 119, 120 및 121; 56, 57, 58, 122, 123 및 124; 59, 60, 61, 125, 83 및 126; 62, 63, 64, 127, 128 및 129; 65, 66, 67, 82, 114 및 130; 68, 69, 70, 131, 132 및 133; 또는 68, 71, 72, 124, 135 및 136에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 서열번호 137 내지 160으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 ApoC3 에피토프에 결합하는, 항체를 제공한다. 한 가지 양태에서, 본 발명은 서열번호 161 내지 183 및 151로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 ApoC3 에피토프에 결합하는, 항체를 제공한다. 특정 양태에서, 본 발명은, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 ApoC3 에피토프에 결합하는, 항체를 제공하고, 상기 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및 183, 또는 160 및 151에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는 초저밀도 지질단백질(VLDL)의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoB의 제거 속도를 증가시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체에서 혈중 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 VLDL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있다.

[0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 본원에 개시된 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0021] 또 다른 양태에서, 본 출원은 본원에 개시된 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는(encoding)

폴리뉴클레오티드(예: 단리된 폴리뉴클레오티드)를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 ApoC3에 결합하는 항체를 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 항체의 발현을 가능하게 하는 조건하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체의 혈액에서 ApoC3의 활성을 억제시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체의 혈액중 트리글리세리드 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체에서 고트리글리세리드혈증을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 출원은 대상체에서 카이로미크론혈증을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 출원은 고트리글리세리드혈증을 갖는 환자에서 심혈관 질환의 위험을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 항체 또는 약제학적 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 심혈관 질환은 심근 경색이다. 특정 실시형태에서, 상기 심혈관 질환은 협심증이다. 특정 실시형태에서, 상기 심혈관 질환은 뇌졸중이다. 특정 실시형태에서, 상기 심혈관 질환은 아테롬성 동맥경화증이다.

[0024] 특정 실시형태에서, 상기 항체는 대상체의 혈액중 카이로미크론(chylomicron) 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시킨다.

[0025] 특정 실시형태에서, 대상체는 추가의 지질 저하제를 제공받는다. 특정 실시형태에서, 추가의 지질 저하제는 HMG-CoA 리덕타제 억제제이다. 특정 실시형태에서, HMG-CoA 리덕타제 억제제는 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴 또는 심바스타틴이다. 특정 실시형태에서, 추가의 지질 저하제는 PCSK9 억제제이다. 특정 실시형태에서, PCSK9 억제제는 알리로쿠맙, 에볼로쿠맙 또는 보코시주맙이다. 특정 실시형태에서, 추가의 지질 저하제는 에제티미브이다. 특정 실시형태에서, 추가의 지질 저하제는 에제티미브 및 HMG-CoA 리덕타제 억제제의 조합이다. 특정 실시형태에서, 추가의 지질 저하제는 에제티미브, HMG-CoA 리덕타제 억제제 및 PCSK9 억제제의 조합이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 디미리스토일포스파티딜 콜린(DMPC)에 대한 ApoC3의 결합에 미치는 ApoC3 항체의 간섭을 나타내는 그래프이다. ELISA 마이크로플레이트를 DMPC로 코팅하고, 시험 항-ApoC3 항체와 혼합된 ApoC3과 함께 배양했다. 플레이트에 부착 상태로 잔류하는 ApoC3의 양은 ELISA 비색 검정의 표준 단계에 따라 비오티닐화 항-ApoC3 폴리클로날 염소 항체로 측정했다.

도 2는 항-ApoC3 항체의 존재하에 VLDL에 대한 ApoC3의 결합을 나타내는 그래프의 세트이다. 부분 A 및 B에서, VLDL은 표면 플라즈몬 공명(SPR) 검정을 위해 표면 상에 고정시켰다. ApoC3 단독("ApoC3"), 14C7 단독("14C7"), 또는 ApoC3 및 14C7("14C7 +") (부분 A); 또는 ApoC3 단독("ApoC3"), 5E5 단독("5E5"), 6A6 단독("6A6"), ApoC3 및 5E5("5E5 +"), 또는 ApoC3 및 6A6("6A6 +") (부분 B)를 t=1800s에서 주사하고, 완충제를 t=2100s에서 주사하여 미결합 분자를 제거했다. 부분 C에서, 리포솜을 비아코어 L1 칩 상에 포획하고, ApoC3를 t=1800s에서 주사하고, 5E5 및 6A6을 t=4400s에서 주사했다. SPR 신호를 측정했다.

도 3은 14C7 및 13G7이 지질단백질 리파제(LPL) 활성을 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시켰음을 나타내는 그래프이다. 14C7, 13G7, 5E5 또는 6A6 항체를 인트라리피드 및 정제된 ApoC3 단백질과 함께 배양했다. 비-에스테르화된 지방산(NEFA)의 생성을 측정하고, 항-ApoC3 항체가 존재하지 않지만 ApoC3의 존재하에 NEFA 생성과 비교하여 생성된 NEFA의 퍼센트를 플롯팅했다.

도 4는 특정 항-ApoC3 항체가 HepG2 세포에 의한 초저밀도 지질단백질(VLDL) 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키고(부분 A) 특정 항-ApoC3 항체가 감쇠시키지 않았음(부분 B)을 나타내는 그래프의 세트이다. HepG2 세포를 단독으로 또는 지시된 항-ApoC3 항체의 존재하에 DiI VLDL 및 정제된 ApoC3과 함께 배양했다. "모타비주맙(Motavizumab)"은, 모타비주맙을 갖지만 항-ApoC3 항체를 첨가하지 않은 음성 대조군 그룹을 지칭한다.

HepG2 세포에 의해 섭취된 DiI VLDL은 DiI 염색의 형광 분광법에 의해 측정했다.

도 5는 인간 ApoC3(huApoC3) 또는 사이노폴리스 원숭이 ApoC3(cynoApoC3)에 대한 14C7(부분 A), 5A7(부분 B), 5E5(부분 C) 및 6A6(부분 D)의 결합을 나타내는 그래프의 세트이다.

도 6은 5E5(부분 A), 6A6(부분 B) 및 14C7(부분 C)의 에피토프 맵핑을 나타내는 그래프의 세트이다. 7, 10 또는 13개 아미노산을 갖는 사이클릭 ApoC3 웨티드의 어레이를 합성했다. 지시된 항-ApoC3 항체와 웨티드와의 결합을 측정하고, 강도 플롯을 결합 친화성에 따라 작성했다. 항체 결합에 기여하는 아미노산을 동정하고 강조했다.

도 7은 5E5(부분 A), 6A6(부분 B) 및 14C7(부분 C)의 에피토프 치환 스캐닝을 나타내는 그래프의 세트이다. 파트 A 및 B에서, 각각의 아미노산을 다른 19개 L-아미노산으로 치환하는 단일 아미노산 돌연변이와 함께 13개 아미노산 DKFSEFWLDPEV(서열번호 44)를 갖는 ApoC3 웨티드의 어레이를 합성했다. 지시된 항-ApoC3 항체와 웨티드와의 결합을 측정했다. 야생형 및 돌연변이체 ApoC3 웨티드의 상대적 결합 친화성을 도시하는 치환 매트릭스를 결합 친화성 데이터로부터 작성했다. 부분 C에서, 각각의 아미노산을 다른 19개 L-아미노산으로 치환하는 단일 아미노산 돌연변이와 함께 13개 아미노산 ARGWVTDGFSSLK(서열번호 45)를 갖는 ApoC3 웨티드의 어레이를 합성했다. 14C7 항-ApoC3 항체와 웨티드와의 결합을 측정했다. 야생형 및 돌연변이 ApoC3 웨티드의 상대적 결합 친화성을 도시하는 치환 매트릭스를 결합 친화성 데이터로부터 작성했다. 각각의 부분 A, B 및 C에서, 제1 컬럼은 하부로부터 상부까지 야생형 ApoC3 웨티드의 서열(서열번호 185 또는 186)을 나타낸다. 제1 컬럼에 제시된 각 위치에서 아미노산 치환은 높은 것(좌측)으로부터 낮은 것(우측)까지 결합 친화성의 순서로 배치한다. 좌측으로부터 우측까지의 각 행에 있어서, 음영의 강도는 최저점까지 감소하고, 이어서 증가한다. 최저점의 좌측에서, 음영의 강도는 결합 친화성과 양으로 상관하고; 최저점의 우측에서, 음영의 강도는 결합 친화성과 음으로 상관한다.

도 8은 AAV8-huApoC3 마우스 모델에서 순환 식후 트리글리세리드에 대한 huApoC3 과발현의 효과를 입증하는 그래프의 세트이다. 마우스를 비히클("무처리") 또는 3×10^{11} 바이러스 입자의 AAV8-huApoC3("+ AAVC3 14일")로 감염시켰다. 올리브유 투여 후에 혈청 트리글리세리드 수준은 AAV8-huApoC3 마우스에서 보다 높았다(부분 A). 트리글리세리드 수준의 곡선하 면적(AUC)은 대응하지 않는 T 시험에 의한 0.0047의 p 값과 함께 38%까지 증가했다(부분 B).

도 9는 5E5의 식후 트리글리세리드-저하 효과를 나타내는 그래프의 세트이다. 비히클 또는 5E5 항체는 3×10^{11} AAV8-huApoC3 바이러스 입자를 제공받은 마우스에게 투여했다. 올리브유의 전체 용량을 제공하고, 트리글리세리드 수준을 시간 경과적으로 측정했다(부분 A). 곡선하 면적("AUC")은 0.030의 p 값과 함께 비히클 대조군과 비교하여 5E5 투여에서 약 25%까지 감소했다(부분 B). 또한, 혈청 ApoC3 수준(부분 C) 및 5E5 항체 수준(부분 D)을 시간 경과적으로 측정했다. 부분 E에서, 항-암탉 난 리소좀 인간 IgG₁ 항체("HyHEL5")를 이소형 대조군으로 사용했다.

도 10은 인간 ApoC3을 발현하는 마우스에게 5E5 및 6A6 항체의 피하 주사후 혈액으로부터 ApoC3 및 ApoB 제거의 가속을 나타내는 일련의 그래프이다. 항-암탉 난 리소좀 인간 G1 항체(HyHEL5)를 5E5에 대한 이소형 대조군으로 사용하고, PBS를 6A6에 대한 비히클 대조군으로 사용했다. 부분 C는 혈장에서 인간 ApoC3의 농도를 나타낸다. 부분 A, B는 음성 이소형 대조군과의 퍼센트 차이로 그래프화하고, D는 항체 투여 직전에 혈액 샘플로부터 측정한 각각의 기준선 수준에 대한 퍼센트 변화로서 그래프화한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고 ApoC3 기능을 억제하는 항체를 제공한다. 또한, 이들 항체를 포함하는 약제학적 조성물, 이들 항체를 코딩하는(encoding) 핵산, 이들 항체를 제조하기 위한 발현 벡터 및 숙주 세포, 및 이들 항체를 사용하여 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 간세포에 의한 TRL 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감소(attenuating)시킬 수 있다. 따라서, 개시된 항-ApoC3 항체는 고트리글리세리드혈증 및 관련 질환(예: 심혈관 질환 및 췌장염)의 치료 및 예방에 유용하다.

[0028] 몇몇 상이한 타입의 항-ApoC3 항체가 본원에 개시되고, 각각은 ApoC3의 상이한 신규 에피토프에 결합하고 상이한 기능적 특성을 갖는다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열[FSEFWLDPE] 내의 에피토프에 결합하고, 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있다. 또는, 특정

실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열[GWVTDGFSSLK] 내의 에피토프에 결합하고, 지질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시킨다.

1. 정의

[0029] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "ApoC3"은 아포지질단백질 C3 단백질을 지칭한다. 특정 실시형태에서, ApoC3은 인간 ApoC3이다. 예시적 인간 ApoC3 아미노산 서열은 RefSeq 수탁번호 NP_000031.1에 기재되어 있다. NP_000031.1의 성숙 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0031] SEAEDASLLSFMQGYMKHATKAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGSSLKDYWSTVKDKFSEFWDLDPVRPTSAVAA (서열번호 1).

[0032] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체" 및 "항체들"은 전장 항체, 전장 항체의 항원-결합 단편, 및 항체 CDR, VH 영역 또는 VL 영역을 포함하는 분자를 포함한다. 항체의 예는 모노클로날 항체, 재조합 생산 항체, 단일특이적 항체, 다중특이적 항체(이중특이적 항체 포함), 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 면역글로불린, 합성 항체, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄 분자를 포함하는 4량체 항체, 항체 경쇄 모노머, 항체 중쇄 모노머, 항체 경쇄 이량체, 항체 중쇄 이량체, 항체 경쇄-항체 중쇄 쌍, 인트라바바디, 헤테로접합 항체, 단일 도메인 항체, 일가 항체, 일본쇄 항체 또는 일본쇄 Fv(scFv), scFv-Fc, 카멜리드 항체(예: 라마 항체), 카멜화 항체, 아피바바디, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 디설파이드-결합된 Fv(sdFv), 항-이디오타입(항-Id) 항체(예를 들면, 항-항-Id 항체 포함) 및 상기 임의의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 폴리클로날 항체 모집단을 지칭한다. 항체는 임의 타입(예: IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY), 임의 부류(예: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 또는 IgA₂) 또는 임의 아부류(예: IgG_{2a} 또는 IgG_{2b})의 면역글로불린 분자의 것일 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 IgG 항체, 또는 이의 부류(예: 인간 IgG₁ 또는 IgG₄) 또는 아부류이다. 특정 실시형태에서, 항체는 인간화된 모노클로날 항체이다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된 항체"는, 이의 천연 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 동정되고 분리 및/또는 회수된 항체를 지칭한다. 용어 "단리된 항체"는 재조합 숙주 세포의 원위치 항체를 포함한다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역"은 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다의 가변 영역 내에서 발견된 불연속 항원 결합 부위를 의미한다. 이들의 특정 영역은 문헌[참조: Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) 및 Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), by Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 및 by MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)]에 기재되어 있고, 이들 모두는 이들의 전체가 본원에서 참조로서 도입되며, 상기 정의는 서로 비교하는 경우에 아미노산 잔기의 중첩 또는 서브세트(subset)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 용어 "CDR"은 문헌[참조: Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) 및 Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991)]에 정의된 CDR이다. CDRH1, CDRH2 및 CDRH3은 중쇄 CDR을 나타내고, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 경쇄 CDR을 나타낸다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프레임워크(FR) 아미노산 잔기"는 면역글로불린 쇄의 프레임워크 영역 중의 이들 아미노산을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "프레임워크 영역" 또는 "FR 영역"은, 가변 영역의 일부이지만 CDR의 일부가 아닌 아미노산 잔기를 포함한다(예를 들면, CDR의 Kabat 정의를 사용).

[0036] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "가변 영역" 및 "가변 도메인"은 호환적으로 사용되고 당해 기술분야에서 일반적이다. 가변 영역은 전형적으로 항체의 일부, 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 일부, 전형적으로 성숙 중쇄에서 약 아미노-말단 110 내지 120 아미노산 또는 110 내지 125 아미노산 및 성숙 경쇄에서 약 90 내지 115 아미노산을 지칭하고, 이는 항체 중에서 서열이 광범위하게 상이하고 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 결합 및 특이성에 사용된다. 서열에서의 가변성은 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리우는 이들 영역에 집중되지만, 가변 도메인에서 보다 고도로 보존된 영역은 프레임워크 영역(FR)으로 불리운다. 어떠한 특정 메카니즘 또는 이론에 구속되는 것을 바라지 않지만, 경쇄 및 중쇄의 CDR은 항체와 항원과의 상호작용 및 특이성에 주로 관여하는 것으로 생각된다. 특정 실시형태에서, 가변 영역은 인간 가변 영역이다. 특정 실시형태에서, 가변 영역은 설치류 또는 뮤린 CDR 및 인간 프레임워크 영역(FR)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 가변 영역은 영장류(예: 비-인간 영장류) 가변 영역이다. 특정 실시형태에서, 가변 영역은 설치류 또는 뮤린 CDR 및 영장류(예: 비-인간 영장류) 프레임워크 영역(FR)을 포함한다.

[0037] 용어 "VL" 및 "VL 도메인"은 항체의 경쇄 가변 영역을 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다.

- [0038] 용어 "VH" 및 "VH 도메인"은 항체의 중쇄 가변 영역을 지칭하기 위해 호환적으로 사용된다.
- [0039] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "불변 영역" 및 "불변 도메인"은 호환적이고 당해 기술분야에서 일반적이다. 불변 영역은 항체 부분, 예를 들면, 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만 다양한 효과기 기능, 예를 들면, Fc 수용체와의 상호작용을 나타낼 수 있는 경쇄 또는 중쇄의 카복실 말단 부분이다. 면역글로불린 분자의 불변 영역은 일반적으로 면역글로불린 가변 도메인과 비교하여 더욱 보존된 아미노산 서열을 갖는다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "중쇄"는, 항체와 관련하여 사용되는 경우, 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 임의의 특수한 타입, 예를 들면, 알파(α), 델타(δ), 앱실론(ϵ), 감마(γ) 및 뮤(μ)를 지칭할 수 있고, 이는 IgG의 아부류, 예를 들면, IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함하여, 각각 항체의 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 부류를 생성한다.
- [0041] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "경쇄"는, 항체와 관련하여 사용되는 경우, 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 임의의 특수한 타입, 예를 들면, 카파(κ) 또는 람다(λ)를 지칭할 수 있다. 경쇄 아미노산 서열은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 특정 실시형태에서, 경쇄는 인간 경쇄이다.
- [0042] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "~에 특이적으로 결합하는"은, 약 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M 미만, 또는 그 이하의 해리 상수(Kd)로 항원에 결합하거나, 비특이적 항원에 대한 이의 친화성보다 적어도 2배 큰 친화성으로 항원에 결합하는, 항체의 능력을 지칭한다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프"는, 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 국재화된 영역을 지칭한다. 에피토프는, 예를 들면, 폴리펩티드의 인접 아미노산(선형 또는 인접 에피토프)일 수 있거나, 에피토프는, 예를 들면, 폴리펩티드 또는 폴리펩티드들의 2개 이상의 비-인접 영역으로부터 형성될 수 있다(입체배좌, 비-선형, 불연속 또는 비-인접 에피토프). 특정 실시형태에서, 항체가 결합하는 에피토프는, 예를 들면, NMR 분광법, X선 회절 결정학 연구, ELISA 검정, 질량 분석과 조합된 수소/중수소 교환(예를 들면, 액체 크로마토그래피 전자분무 질량 분광법), 웨პ티드 스캐닝 검정, 또는 돌연변이유발 맵핑(예: 부위-지시된 돌연변이유발 맵핑)에 의해 측정할 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 본원에 기재된 치료학적 또는 예방학적 처치를 지칭한다. "치료"의 방법은, 질환 또는 장애를 갖거나 이러한 질환 또는 장애를 갖는 경향이 있는 대상체에게 항-ApoC3 항체의 투여를 사용하여, 질환 또는 장애 또는 재발하는 질환 또는 장애를 예방, 치유, 지연시키고, 이의 증증도를 감소시키고, 이의 발증 위험을 감소시키거나, 질환 또는 장애 또는 재발하는 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화시키거나, 이러한 치료의 부재하에 예상되는 것을 초과하여 대상체의 생존을 연장시키는 것이다.
- [0045] 본원에 사용된 바와 같이, 대상체에 대한 요법의 투여의 문맥에서 용어 "유효량"은 목적하는 예방적 또는 치료적 효과를 달성하는 요법의 양을 지칭한다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "또는"은 및/또는을 의미한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약" 및 "대략"은, 수치 또는 수치 범위를 변경하기 위해 사용되는 경우, 수치 또는 범위의 5% 내지 10% 초과 및 5% 내지 10% 미만의 편차가 제시된 수치 또는 범위의 의도된 의미의 범위 내에 있는 것을 나타낸다.
- [0049] **2. 항-ApoC3 항체**
- [0050] 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고 ApoC3 기능을 억제하는 항체(예: 단리된 항체)를 제공한다.
- [0051] 특정 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는 포유동물의 ApoC3 단백질에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는 인간 ApoC3에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*) (사이노몰거스 원숭이) ApoC3에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는 뮤린 ApoC3에 결합한다.
- [0052] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감소시킨다(생체내 또는 시험판내). 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, TRL(예: VLDL) 또는 TRL

잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 감소시킨다.

[0053] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여하는 경우, 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 식후 고지혈증을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 억제시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 식후 고지혈증을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 억제시킬 수 있다.

[0054] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여하는 경우, 식후 카이로미크론(chylomicron) 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 식후 카이로미크론 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 식후 카이로미크론 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 감소시킬 수 있다.

[0055] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 단리된 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 제거(clearance) 속도(rate)를 증가시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는, 본원에 개시된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 제거 속도를 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 증가시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 개시된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 제거 속도를 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 증가시킬 수 있다. ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 제거 속도를 평가하는 방법은, 제한 없이, 동위체가 방사성 또는 안정성일 수 있는, 동위체 트레이서 기술을 포함한다.

[0056] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 단리된 항체는 대상체에서 혈액중 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는, 본원에 개시된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 혈액중 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 개시된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체에서 혈액중 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 감소시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체에서 혈액중 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준 감소는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42 또는 48시간 동안 유지된다.

[0057] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는 TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 감쇠시킨다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 1, 2, 3, 4 또는 5 μ M의 농도에서 TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 50% 감쇠시킨다.

[0058] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는 지질 또는 지질단백질에 대한 ApoC3의 결합을 억제시킨다. 특정 실시형태에서, 지질은 지방산 쇄를 포함한다. 특정 실시형태에서, 지질은 포스파티딜 그룹을 포함한다. 특정 실시형태에서, 지질은 포스파티딜콜린(예: DMPC), 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜이노시톨 또는 포스파티딜글리세롤을 포함한다. 특정 실시형태에서, 지질은 트리글리세리드이다. 특정 실시형태에서, 지질단백질은 TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물이다. 특정 실시형태에서, 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 지질 및 지질단백질(예: 트리글리세리드, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물)에 대한 ApoC3의 결합을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 억제시킨다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는, 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 지질 및 지질단백질(예: 트리글리세리드, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물)에 대한 ApoC3의 결합을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 감쇠시킨다.

[0059] 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는, 본원에 기재된 방법(예: 실시예 3) 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 지질-결합된 ApoC3(예: 트리글리세리드, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물)에 결합된 ApoC3에 결합할 수 있다.

[0060] 본원에 개시된 항체는 상기 실시형태에 기재된 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상 또는 모든 특성을 가질 수 있다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는 TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감쇠시킬 수 있고, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 1, 2, 3, 4 또는 5 μ M의 농도에서 적어도 50% 감쇠시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체는 TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감쇠시키고, 지질-결합된 ApoC3(예: 트리글리세리드, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물)에 결합할 수 있다.

[0061] 임의의 적합한 검정을 사용하여, 본원에 개시된 항체의 상기 기능적 활성을 측정할 수 있다. 예시적 검정은 본원의 실시예에 개시된 기능적 검정을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0062] 예시적 항-ApoC3 항체의 아미노산 서열은 본원에서 표 1 내지 4에 기재되어 있다.

[표 1]

[0064]

예시적 항-ApoC3 항체의 중쇄 CDR 아미노산 서열

VH 클론	CDRH1	서열 번호	CDRH2	서열 번호	CDRH3	서열 번호
5A11	TRYYA	4	VIAYDGSTYYSPSLKS	5	VRLIEAPYELYDY	6
5E5	TYSMR	7	SISTDGGGTAYRDSVKKG	8	AGYSD	9
6A6	SYAGR	10	SINAGGGSTSYADSVK	11	NSYRY	12
8F4	SYSMY	13	AIKTDGGSTNYADSVKG	14	QGYGT	15
11H1	SYSMR	16	SIKSDGSITSYADSVKG	17	QGYIN	18
5A4	HYTMY	19	AISGGGDRTIYTDSVKKG	20	QGYEY	21
5A7	NRRYA	22	VIVYDGDNTHVSPSLRS	23	VLLLRDPLSLDY	24
8A4	NYAMR	25	SIDSGGDRTKYGDSVKKG	26	QGYIF	27
8B4	NAYLY	28	GINPAGDGRAYATSVKG	29	ASRVVAYDS	30
8H4	SYSMR	16	SINSDGGSTKYSDSVKG	31	QGYTD	32
10B6	SYAMR	33	SINIDGGSTRYTDSVQG	34	QGYIY	35
12A3	NYAMR	25	SINIAGSSVYADSVK	36	QGFVY	37
12C3	SYSMF	38	GINGGGDRSNYADSVRD	39	QGYAY	40
12C12	TSYYAWT	41	AIVYDGSTFYSPSLKS	42	SYGLGLYDL	43
12D1	TYSMR	7	SISTDGGGTAYRDSVKKG	8	AGYSD	9
12D4	SSNMR	47	TISPDGGKTLYADSVKG	48	AGYDY	49
12E12	NIYMS	50	AINTAGTVTYYADSVKG	51	GEVD	52
13C7	RYYMS	53	SIYKDGSNTYYADSVKG	54	ALRAEYDY	55

[0065]

13G7	TTAPAWG	56	VIAFDGSAYYSPSLKS	57	LGGRNYPPYVEL	58
14C4	NYDMS	59	VINSDGDGTYYVDSVKKG	60	ANLGL	61
14C7	TNSYYWS	62	AIDYSGDTYYSPSLKS	63	RIPTGEY	64
14G4	RYTMN	65	AISPDGGKTIDADSVK	66	GHNMDY	67
12D7	DYAMS	68	AITSNKGRTDYAESMK	69	GPPHYIPIPSMTPRD S	70
12G8	DYAMS	68	AIRWNGDTYYAESMK	71	HRPGGALDT	72

[0066]

[0067]

[표 2]

[0068]

예시적 항-ApoC3 항체의 경쇄 CDR 아미노산 서열

VL 클론	CDRL1	서열 번호	CDRL2	서열 번호	CDRL3	서열 번호
5A11	GLSSGSVTTRSYPG	73	STSSRHS	74	ALDIGSYIV	75
5E5	KTSQGLVHSDGKTYFY	76	QVSNRAS	77	AQGTYYPHT	78
6A6	KASQSLIHTDGKTYLY	79	QVSSHES	80	AQATYNPRT	81
8F4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNRGS	83	AQATYYGHS	84
11H1	RASQSLIHSAGKTYFY	85	QVSNRES	86	AQGTYNPKT	87
5A4	KAIQSLVHTDGKTYLY	88	QVSNRGS	83	AQGTYSSKT	89
5A7	AGTSSDIGAYNFVS	90	DIDKRAS	91	AAYGSRDNVV	92
8A4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNHES	93	AQATYYPLT	94
8B4	KSSQSVESGSDQKSYLN	95	YASTQES	96	QQAYSAPFT	97
8H4	KVSQSLVHSDGKTYLY	98	QVSNRDS	99	AQGTYNPYT	100
10B6	KASQSLVHSNGVIYFY	101	QVSNRDS	99	AQGTYYPHS	102
12A3	KAGRSLVHSDGRTYLY	103	QVSNRSS	104	AQGTYYPVT	105
12C3	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QTSNRGS	106	AQATYSPHT	107
12C12	TGSSSNIGDNYVN	108	SNSNRAS	109	SSWDDSLSGVV	110
12D1	KTSQSLTHSDGKTYLY	111	QVSNRGS	83	AQATYYPHT	113
12D4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNQGS	114	AQATYAPHS	115
12E12	GLSSGSVTSVTYPG	116	NTNSRFS	117	SVYIGGGIYPAV	118
13C7	AGTSSDIGGYNYVA	119	EVNKRAS	120	ASYRSSNSYV	121

[0069]

13G7	QGGSLRVSYAH	122	DDDSRPS	123	QSADSSGDNWV	124
14C4	KATQSLVHSDGKTYLS	125	QVSNRGS	83	AQAPYWT	126
14C7	GLNSGSVTSSNYPD	127	NTNSRHS	128	ALYMGSDSVV	129
14G4	KASQSLVHSDGKTYLY	82	QVSNQGS	114	AQATYTPRT	130
12D7	QGGTLGRYYGS	131	GDNSRPS	132	ESFDFSGNAAV	133
12G8	QGGNFGNFYAS	134	KDSERPS	135	QSGSSSDNVV	136

[0070]

[표 3]

[0072]

예시적 항-ApoC3 항체의 VH 아미노산 서열

VH 클론	아미노산 서열	서열번호
5A11	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGSITTRYAWSWIRQPPG KGLEWMGVIAYDGSTYYSPSLKSRTSISRDTSKNQFSQLQLTSVTP EDTAVYYCARVRLIEAPYELYDYGQGTQVTVSS	137
5E5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRK ALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNL KPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	138
6A6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAGRWVRQVPGK GLEWVSSINAGGGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK PEDTAVYYCTQNSYRWGQGTQVTVSS	139
8F4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYSMYWVRQAPGK GLERVAAIKTDGGSTNYADSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSL KSEDTAVYYCVIQQGYGTWGQGTQVTVSS	140
11H1	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMRWVRQAPGK GLEWLSSIKSDGSITSYADSVKGRFTMSRDNAKNTLYLQMNSLK SEDTAMYYCTNQGYINWGQGTQVTVSS	141
5A4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFAFSHYTMYWVRQAPVR GLERVSAISGGGDRTIYTDSVKGRFTISRDNAANALYLQMNSLQ PEDTAVYYCVAQGYEYWGQGTQVTVSS	142
5A7	EVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGASITNRRYAWTWIRQPPG KGLEWMGIVYDGNTVSPSLRSRTSISRDTSKNQFSQLQLSSLTP EDTAVYYCARVLLRDPLSLDYWGQGTQVTVSS	143
8A4	QVQLVESGGGLVQPGGSLKVSVCTASGFTFNNYAMRWVRQAE KGLEWVSSIDSGGDRTKYGDGVKGRFTISRDNAKNTVYLQMDA LKPEDTGVYYCVSQGYIFWGQGAQVTVSS	144
8B4	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAYLYWVRQVPGK GLEWVSGINPAGDGRAYATSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNTL ESDDTAVYYCATASRVVAYDSWGQGTQVTVSS	145

[0073]

8H4	ELQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSMRWVRQTPGKG LEWVTSINSDGGSTKYSDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNVKP EDTAYYCAIQGYTDWGQGTQVTVSS	146
10B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMRWVRQAPGK GLEWISSINIDGGSTRYTDVQGRFTVSRDNAKNTLYLQMNNLK PEDTGIYYCTIQGYIYWGQGTQVTVSS	147
12A3	ELQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFTFSNYAMRWVRQAPGG RLEWVSSINIAQSSVYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLK SEDTAVYYCAMQGFVYWGQGTQVTVSS	148
12C3	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMFVWRQSPGKG LERVSGINGGGDRSNYADSVRDRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKS EDTAVYYCVIQQGYAYWGQGTQVTVSS	149
12C12	EVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTSYYAWTWIRQPPG KGLEWVGAIVYDGSTFYSPSLKSRTSISRDTSKSQFSQLQLSSVTPE DTAVYYCARSYGLGLYDLWGQGTQVTVSS	150
12D1	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPRK ALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNNL KPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	138
12D4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSSNMRWVRQVSGK GLEWVSTISPDKTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLHLQMVSLSK PEDTALYYCVKAGYDYWGQGTQVTVSS	152
12E12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRVSCAASGLTFSNIYMSWVRQAPGK GLEWVSAINTAGTVTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL KPEDTAHYCTTGEVDWGKGTLVTVSS	153
13C7	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSRYMSWVRQAPGK GLEWVSSIYKDGNTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL KSEDTAVYYCAKALRAEYDYWGQGTQVTVSS	154
13G7	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISTTAPAWGWIRQSPG KGLDWMAVIAFDGSAYYSPSLKSRTLISRDTSKNQFSQLQLSSVTP EDTAVYYCARLGGRNYPPYVELWGQGTQVTVSS	155

[0074]

14C4	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGNYDMSWVRQAPGK GPEWVSVINSQGDGTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSL KPEDRAVYYCAIANGLWGQGTLTVSS	156
14C7	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGSITNSYYWSWIRQPPG KGLEWMGAIDYSGDTYYSPSLKSRTSISRDTSKNQFTLQLTSVTP EDTAVYYCVSRIPTGEYWQGQTQVTVSS	157
14G4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYTMNWVRQAPGK GLEWLSAISPDGGKTIDADSVKGAFASSRDNTMNTLYLDMNSL KPEDAAVYYCVAGHNMDYWGKGILTVSS	158
12D7	ELQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGK GLEWVSAITSNGKRTDYAESMKGRFTISRDNSKNTLYLEMNSLK SEDTAVYYCTKGPPHYIPIPSMTPRDSWGQGTQVTVSS	159
12G8	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQAPGK GLEWVSAIRWNGDTYYAESMKGRFDMSRDNAKNTLYLQMNSL KSEDTAVYYCAKHRPGGALDTWGQGTLTVSS	160

[0075]

[표 4]

[0077]

예시적 항-ApoC3 항체의 VL 아미노산 서열

VL 클론	아미노산 서열	서열번호
5A11	QAVVTQEPLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTRSYPGWFQQTPGQ APRSЛИHSTSSRHSGIPTRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYYC ALDIGSYIVFGGGTHLTVL	161
5E5	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQK PGQSPQQLIYQVSNRASGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDA GVYYCAQGTYYPHTFGSGTRLEIK	162
6A6	DVVLTQTPGSLSVVPGESASISCKASQSLIHTDGKTYLYWLLQKP GQRPQLLIYQVSSHESGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAGV YYCAQATYNPRTFGQGTTKLEIK	163
8F4	DLVLTQIPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLLQKP GQSPQRLIYQVSNRGSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAG VYYCAQATYYGHSFGSGTRLEIK	164
11H1	ATMLTQSPGSLTIVPGESASISCRASQSLIHSAGKTYFYWLLQKP GQRPQLLIYQVSNRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAG VYYCAQGTYNPKTFGQGTTKLEIK	165
5A4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKAIQSLVHTDGKTYLYWFLQK PGQSPQRLIYQVSNRGSGVDPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAG VYYCAQGTYSSKTFGQGTTKLEIK	166
5A7	SSALTQPPSMSGTLGKTLTISCAGTSSDYGAYNFVSWYQQLPFTA PKLLIYDIDKRASGIPDRFSGSKSGNTASLSISGLQSEDEADYYCA AYGSRDNVVFGGGTHLTVL	167
8A4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLLQK PGQRPQLLIYQVSNHESGVDPDRFTGSGSGTDYTLKISGVKAEDA GVYYCAQATYYPLTFGQGTTKVELK	168
8B4	EIVLTQSPSSVTASVGEKVTINCKSSQSVEGSDQKSYLNWYQQ RPGQSPRLLIYYASTQESGIPDRFSGSGSTTDFTLTISSVQPEDAA VYYCQQAYSAFTFGQGTTKVELK	169

[0078]

8H4	DVVLTQTPGSLSVVPGESASISCKVSQSLVHSDGKTYLYWLLQK PGQSPQRILYQVSNRDGSVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAG VYYCAQGTYNPYTFGSGTRLEIK	170
10B6	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSNGVIYFYWLLQK PGQSPQRILYQVSNRDGSVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAG VYYCAQGTYYPHSGSGTRLQIK	171
12A3	DVVLTQTPGSLSVVPGESANISCKAGRSLVHSDGRTYLYWLLQK PGQSPQRILYQVSNRSSGVPDFRTGSGSGTDFTLKITGVKAEDAG VYYCAQGTYYPTFGQGKTVELK	172
12C3	DVVLTQTPASLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLLQK PGQSPQRILYQTSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLDISGVKAEDAG VYYCAQATYSPHTFGSGTRLEIK	173
12C12	QAVLTQPPSVSGSPGQKFTISCTGSSNIGDNYVNWYQHLPGTAP KLLIYNSNSNRASGVPDFRSGSKSGSSASLTITGLQAEDEADYYCS SWDDSLSGVVFGGGTHLTVL	174
12D1	SALDVVLTQTPGSLSVVPGESASISCKTSQSLTHSDGKTYLYWLL QKPGQSPQRILYQVSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAED AGMYYCAQATYYPHTFGSGSRLEIER	175
12D4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLLQK PGQSPQRILYQVSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDA GVYYCAQATYAPHSGSGTRLEIK	176
12E12	QTVVTQEPLSVSPGGTVLTCGLSSGSVTSVTPGWWYQQKPGQ APRTLIYNTNSRFSGVPNRFSGSISGNKAALTITGALPEDEADYY CSVYIGGGIYPAVFGGGTHLTVL	177
13C7	NFMLTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDIGGYNYVAWYQQLPGT APKLLISEVNKRASGIPDRFSGSKSGNTASLSISGLQSEDEADYYC ASYRSSNSYVFGGGTKLTVL	178
13G7	QPVLTQPPALSVTLGQTAKITCQGGSLRVSYAHWYQQKPGQAP VLVSYDDDSRPSGIPERFSGSGSGATATLTISGAQAEDEGDYYCQ SADSSGDNWVFGGGTHLTVL	179

14C4	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKATQSLVHSDGKTYLSWLLQK PGQSPQRILYQVSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDAG VYYCAQAPYWTFGQGKLEIK	180
14C7	QTVVTQEPLSVSPGGTVLTCGLNSGSVTSSNYPDWYQQKPGQ APRLLIYNTNSRHSVPSRFSGSISGNKAALTITGAQPEDEADYY CALYMGSDSVVFGGGTHLTVL	181
14G4	DVVLTQTPGSLSVVPGESASISCKASQSLVHSDGKTYLYWLLQK PGQSPQRILYQVSNRGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVKAEDA GVYYCAQATYTPRTFGQGTTLEVK	182
12D7	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGTLGRYYGSWYQQKPAQAP VLLIYGDNSRPSGIPERFSGSKSGDTATLTISGTQAEDEEADYYCES FDFSGNAAVFGGGTHLTVL	183
12G8	QAVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGNFYASWYQQKPGQAP VLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISGAQAEDEADYYCQS GSSSDNVVFGGGTHLTVL	151

[0079]

한 가지 양태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 본원의 표 3에 기재된 VH 도메인의 1, 2 또는 3개 모두의 CDR을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 표 3에 기재된 VH 도메인 중 하나의 CDRH1을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 표 3에 기재된 VH 도메인 중 하나의 CDRH2를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 표 3에 기재된 VH 도메인 중 하나의 CDRH3을 포함한다.

[0082]

또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 본원의 표 4에 기재된 VL 도메인의 1, 2 또는 3개 모두의 CDR을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 표 4에 기재된 VL 도메인 중 하나의 CDRH1을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 표 4에 기재된 VL 도메인 중 하나의 CDRH2를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 표 4에 기재된 VL 도메인 중 하나의 CDRH3을 포함한다.

- [0083] 특정 실시형태에서, 항체의 CDR은 문헌[참조: Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) 및 Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest (1991)]에 따라 결정할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항체의 경쇄 CDR은 카밧(Kabat)에 따라 결정되고, 항체의 중쇄 CDR은 맥칼럼(MacCallum)(상기 참조)에 따라 결정된다.
- [0084] 특정 실시형태에서, 항체의 CDR은 초티아(Chothia) 넘버링 도식에 따라 결정될 수 있고, 이는 면역글로불린 루프의 위치를 지칭한다[참조: Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; 및 U.S. Patent No. 7,709,226]. 전형적으로, 카밧(Kabat) 넘버링 규칙을 사용하는 경우, 초티아 CDRH3 루프는 중쇄 아미노산 26 내지 32, 33 또는 34에 존재하고, 초티아 CDRH2 루프는 중쇄 아미노산 52 내지 56에 존재하고, 초티아 CDRH3 루프는 중쇄 아미노산 95 내지 102에 존재하는 반면, 초티아 CDRL1 루프는 경쇄 아미노산 24 내지 34에 존재하고, 초티아 CDRL2 루프는 경쇄 아미노산 50 내지 56에 존재하고, 초티아 CDRL3 루프는 경쇄 아미노산 89 내지 97에 존재한다. 카밧 넘버링 규칙을 사용하여 넘버링하는 경우, 초티아 CDRH1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32 내지 H34의 사이에서 상이하다(이는 카밧 넘버링 도식이 H35A 및 H35B에 삽입을 위치시키기 때문이고; 35A 또는 35B가 존재하지 않는 경우, 루프는 32에서 종결하고; 35A만이 존재하는 경우, 루프는 33에서 종결하고, 35A 및 35B 둘 다가 존재하는 경우, 루프는 34에서 종결한다).
- [0085] 특정 실시형태에서, 항체의 CDR은 문헌[참조: Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7: 132-136 및 Lefranc M-P *et al.*, (1999) Nucleic Acids Res 27: 209-212]에 기재된 바와 같이 IMGT 넘버링 시스템에 따라 결정될 수 있다. IMGT 넘버링 도식에 따르면, CDRH1은 위치 26 내지 35에 존재하고, CDRH2는 위치 51 내지 57에 존재하고, CDRH3은 위치 93 내지 102에 존재하고, CDRL1은 위치 27 내지 32에 존재하고, CDRL2는 위치 50 내지 52에 존재하고, CDRL3은 위치 89 내지 97에 존재한다.
- [0086] 특정 실시형태에서, 항체의 CDR은 AbM 넘버링 도식에 따라 결정될 수 있고, 이는 AbM 초가변(hypervariable) 영역을 지칭하고, 카밧 CDR 및 초티아 구조적 루프 사이의 타협을 나타내고, 옥스포드 분자 AbM 항체 모델링 소프트웨어(Oxford Molecular Group, Inc.)에 의해 사용된다.
- [0087] 특정 실시형태에서, 항체의 CDR은 문헌[참조: MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745]에 따라 결정될 수 있다. 또한, 문헌[참조: Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in *Antibody Engineering*, Kontermann and Dubel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)]을 참조한다.
- [0088] 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 표 3에 기재된 VH 도메인의 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 표 4에 기재된 VL 도메인의 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 각각의 CDR은 본원에 개시된 CDR의 카밧, 초티아, IMGT, 맥칼럼 또는 AbM 정의에 따라 독립적으로 정의된다.
- [0089] 또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는
- [0090] (a) 서열번호 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 33, 38, 41, 47, 50, 53, 56, 62, 65 또는 68의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH1; 또는
- [0091] (b) 서열번호 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 31, 34, 36, 39, 42, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69 또는 71의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH2; 또는
- [0092] (c) 서열번호 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 32, 35, 37, 40, 43, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70 또는 72의 아미노산 서열을 포함하는 CDRH3; 또는
- [0093] (d) 서열번호 73, 76, 79, 82, 85, 88, 90, 95, 98, 101, 103, 108, 111, 116, 119, 122, 125, 127, 131 또는 134의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL1; 또는
- [0094] (e) 서열번호 74, 77, 80, 83, 86, 91, 93, 96, 99, 104, 106, 109, 114, 117, 120, 123, 128, 132 또는 135의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL2; 또는
- [0095] (f) 서열번호 75, 78, 81, 84, 87, 89, 92, 94, 97, 100, 102, 105, 107, 110, 113, 115, 118, 121, 124,

126, 129, 130, 133 또는 136의 아미노산 서열을 포함하는 CDRL3을 포함한다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는, 각각 서열번호 4, 5 및 6; 7, 8 및 9; 10, 11 및 12; 13, 14 및 15; 16, 17 및 18; 19, 20 및 21; 22, 23 및 24; 25, 26 및 27; 28, 29 및 30; 16, 31 및 32; 33, 34 및 35; 25, 36 및 37; 38, 39 및 40; 41, 42 및 43; 47, 48 및 49; 50, 51 및 52; 53, 54 및 55; 56, 57 및 58; 59, 60 및 61; 62, 63 및 64; 65, 66 및 67; 68, 69 및 70; 또는 68, 71 및 72에 기재된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 7, 8 및 9에 기재된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 10, 11 및 12에 기재된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 62, 63 및 64에 기재된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 아미노산 서열을 포함하는 VH 도메인을 포함한다.

[0097] 또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 73, 74 및 75; 76, 77 및 78; 79, 80 및 81; 82, 83 및 84; 85, 86 및 87; 88, 83 및 89; 90, 91 및 92; 82, 93 및 94; 95, 96 및 97; 98, 99 및 100; 101, 99 및 102; 103, 104 및 105; 82, 106 및 107; 108, 109 및 110; 111, 83 및 113; 82, 114 및 115; 116, 117 및 118; 119, 120 및 121; 122, 123 및 124; 125, 83 및 126; 127, 128 및 129; 82, 114 및 130; 131, 132 및 133; 또는 124, 135 및 136에 기재된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 76, 77 및 78에 기재된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 79, 80 및 81에 기재된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 각각 서열번호 62, 63 및 64에 기재된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함한다.

[0098] 또 다른 양태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역은 각각 서열번호 4, 5, 6, 73, 74 및 75; 7, 8, 9, 76, 77 및 78; 10, 11, 12, 79, 80 및 81; 13, 14, 15, 82, 83 및 84; 16, 17, 18, 85, 86 및 87; 19, 20, 21, 88, 83 및 89; 22, 23, 24, 90, 91 및 92; 25, 26, 27, 82, 93 및 94; 28, 29, 30, 95, 96 및 97; 16, 31, 32, 98, 99 및 100; 33, 34, 35, 101, 99 및 102; 25, 36, 37, 103, 104 및 105; 38, 39, 40, 82, 106 및 107; 41, 42, 43, 108, 109 및 110; 7, 8, 9, 111, 83 및 113; 47, 48, 49, 82, 114 및 115; 50, 51, 52, 116, 117 및 118; 53, 54, 55, 119, 120 및 121; 56, 57, 58, 122, 123 및 124; 59, 60, 61, 125, 83 및 126; 62, 63, 64, 127, 128 및 129; 65, 66, 67, 82, 114 및 130; 68, 69, 70, 131, 132 및 133; 또는 68, 71, 72, 124, 135 및 136에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역은 각각 서열번호 7, 8, 9, 76, 77 및 78에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역은 각각 서열번호 10, 11, 12, 79, 80 및 81에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체를 제공하고, 상기 항체는 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 영역은 각각 서열번호 62, 63, 64, 127, 128 및 129에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.

[0099] 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고, 서열번호 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 또는 160에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%(예: 적어도 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,

93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는, 서열번호 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 또는 160에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 138에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 139에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 157에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0100] 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고, 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183 또는 151에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%(예: 적어도 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183 또는 151에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 162에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 163에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 181에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0101] 또 다른 양태에서, 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하고, 서열번호 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 또는 160에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%(예: 적어도 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183 또는 151에 기재된 아미노산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%(예: 적어도 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 서열번호 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 또는 160에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183 또는 151에 기재된 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및 183, 또는 160 및 151에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 각각 서열번호 138 및 163에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 각각 서열번호 139 및 163에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 항체는 각각 서열번호 157 및 181에 기재된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0102] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 항체, 예를 들면, 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및 183, 또는 160 및 151에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체와 동일하거나 중첩하는 ApoC3 에피토프(예: 인간 ApoC3의 에피토프)에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 항체의 에피토프는, 예를 들면, NMR 분광법, 표면 플라즈몬 공명(BIAcore[®]), X선 회절 결정학 연구, ELISA 검정, 질량 분석과 조합된 수소/중수소 교환(예를 들면, 액체 크로마토그래피 전자분무 질량 분광법), 펩티드 스캐닝 검정, 또는 돌연변이유발 맵핑(예: 부위-지시된 돌연변이유발 맵핑)에 의해 측정할 수 있다.

[0103] 특정 양태에서, 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 결합하기 위해, 각각 서열번호 137 및 161, 138 및 162, 139 및 163, 140 및 164, 141 및 165, 142 및 166, 143 및 167, 144 및 168, 145 및 169, 146 및 170, 147 및 171, 148 및 172, 149 및 173, 150 및 174, 138 및 175, 152 및 176, 153 및 177, 154 및 178, 155 및 179, 156 및 180, 157 및 181, 158 및 182, 159 및 183, 또는 160 및 151에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영

역 아미노산 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 단리된 항체를 제공한다. 경쟁적 결합은 시험하의 면역글로불린이 공통 항원에 대한 참조 항체, 예를 들면, ApoC3(예: 인간 ApoC3)의 특이적 결합을 억제하는 검정으로 결정할 수 있다. 다수 유형의 경쟁적 결합 검정, 예를 들면, 고상 직접 또는 간접 방사선면역검정(RIA), 고상 직접 또는 간접 효소 면역검정(EIA), 샌드위치 경쟁 검정[참조: Stahli C *et al.*, (1983) Methods Enzymol 9: 242-253]; 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA[참조: Kirkland TN *et al.*, (1986) J Immunol 137: 3614-9]; 고상 직접 표지된 검정, 고상 직접 표지된 샌드위치 검정[참조: Harlow E & Lane D, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press]; I-125 표지를 사용한 고상 직접 표지 RIA[참조: Morel GA *et al.*, (1988) Mol Immunol 25(1): 7-15]; 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA[참조: Cheung RC *et al.*, (1990) Virology 176: 546-52]; 및 직접 표지된 RIA[참조: Moldenhauer G *et al.*, (1990) Scand J Immunol 32: 77-82]이 공지되어 있다. 전형적으로, 이러한 검정은 이들, 즉 비표지된 시험 면역글로불린 및 표지된 참조 면역글로불린 중의 어느 하나를 포함하는 고체 표면 또는 세포에 결합된 정제된 ApoC3(예: 인간 ApoC3)의 사용을 수반한다. 경쟁 억제는 시험 면역글로불린의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정할 수 있다. 통상적으로, 시험 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 통상적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 이는 공통 항원에 대한 참조 항체의 특이적 결합을 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% 또는 그 이상 억제할 것이다. 경쟁 결합 검정은 표지된 항체 또는 표지된 항체 중의 어느 하나를 사용하여 다수의 상이한 포맷으로 구성할 수 있다. 이러한 검정의 일반 범위에서, 항원은 96-웰 플레이트 상에 고정된다. 이어서, 항원에 대한 표지된 항체의 결합을 차단하는 비표지된 항체의 능력을 방사성 또는 효소 표지를 사용하여 측정한다. 추가의 상세는 문헌[참조: Wagener C *et al.*, (1983) J Immunol 130: 2308-2315; Wagener C *et al.*, (1984) J Immunol Methods 68: 269-274; Kuroki M *et al.*, (1990) Cancer Res 50: 4872-4879; Kuroki M *et al.*, (1992) Immunol Invest 21: 523-538; Kuroki M *et al.*, (1992) Hybridoma 11: 391-407 및 Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow E & Lane D editors *supra*, pp. 386-389]을 참조한다.

[0104] 특정 실시형태에서, 본 발명은 아미노산 서열 FSEFWDLDPE(서열번호 3) 내의 ApoC3 에피토프에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3 내의 적어도 하나의 아미노산을 포함하고, 서열번호 3에 인접하는 서열번호 1로부터의 하나 이상의 아미노산을 임의로 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5, 6, 8 또는 10에 적어도 하나의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5, 6, 8 또는 10에 적어도 2개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5, 6, 8 또는 10에 적어도 3개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5, 6, 8 또는 10에 적어도 4개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 5 및 6에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5 및 6에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5 및 8에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 2, 5 및 8에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 6 및 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 8 및 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 6 및 8에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 3의 위치 6, 8 및 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 결합하기 위해, 각각 서열번호 138 및 162; 또는 139 및 163에 기재된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 항체는 상보성 결정 영역 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 갖는 중쇄 가변 영역 및, 상보성 결정 영역 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3는 각각 서열번호 7, 8, 9, 76, 77 및 78; 또는 10, 11, 12, 79, 80 및 81에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 138 및 162; 또는 139 및 163에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 항체는 하기 특성 중의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 모두를 임의로 추가로 갖는다: (a) 항체는 지질-결합된 ApoC3(예: 트리글리세리드, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물에 결합된 ApoC3)에 결합할 수 있고; (b) 항체는 TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시킬 수 없고(예를 들면, 항체는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 μ M의 농도에서 TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 50% 미만 감쇠시킨다); (c) 항체는 TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감쇠시킬 수 있고; (d) 항체는, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여하는 경우, 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있고(예를 들면, 대상체의 혈청에서 식후 트리글리세리드의

증가된 수준을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 억제시킴); (e) 항체는, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여하는 경우, 대상체에서 식후 카이로미크론 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시킬 수 있고; (f) 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB의 제거 속도를 증가시킬 수 있고; (g) 항체는 대상체에서 혈액중 ApoC3의 수준을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 감소시킬 수 있고; 및 (h) 항체는 대상체에서 혈액중 ApoB의 수준을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 감소시킬 수 있고, 여기서 상기 특징은 본원에 기재된 방법 및 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가된다.

[0105]

특정 실시형태에서, 본 발명은 아미노산 서열 GWVTDGSSLK(서열번호 2) 내의 ApoC3 에피토프에 결합하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 상기 에피토프는 서열번호 2 내에 적어도 하나의 아미노산을 포함하고, 임의로 서열번호 2에 인접한 서열번호 1로부터의 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 하나의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 2개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 3개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 4개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7, 9 또는 10에 적어도 5개의 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 4 및 9에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4 및 6에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6 및 9에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 9 및 10에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프는 서열번호 2의 위치 1, 4, 6, 7 및 9에 아미노산을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 결합하기 위해, 각각 서열번호 157 및 181에 기재된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 단리된 항체를 제공한다. 특정 실시형태에서, 항체는 상보성 결정 영역 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 상보성 결정 영역 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고, 여기서 상기 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3은 각각 서열번호 62, 63, 64, 127, 128 및 129에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호 157 및 181에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 항체는 하기 특성 중의 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상 또는 모두를 임의로 추가로 포함한다: (a) 항체는 1, 2, 3, 4 또는 5 μ M의 농도에서 TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 50% 감소시킬 수 있고; (b) 항체는 지질 및 지질단백질(예: 트리글리세리드, TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물)에 대한 ApoC3의 결합을 적어도 70% 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 억제시킬 수 있고; (c) 항체는 TRL(예: VLDL) 또는 TRL 잔존물의 간세포 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 감소시킬 수 있고; (d) 항체는, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여하는 경우, 대상체에서 식후 고지혈증을 억제시킬 수 있고; (e) 항체는, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여하는 경우, 대상체에서 식후 카이로미크론 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시킬 수 있고; (f) 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB의 제거 속도를 증가시킬 수 있고; (g) 항체는 대상체에서 혈액중 ApoC3 및/또는 ApoB의 수준을 감소시킬 수 있고, 여기서 상기 특성은 본원에 기재된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가된다.

[0106]

임의의 Ig 불변 영역을 본원에 개시된 항체에서 사용할 수 있다. 특정 실시형태에서, Ig 영역은 인간 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 또는 IgY 면역글로불린 분자, 임의 부류(예: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ 및 IgA₂) 또는 임의 아부류(예: IgG_{2a} 및 IgG_{2b})의 면역글로불린 분자이다.

[0107]

3. 사용 방법

[0108]

ApoC3은 간세포에 의한 TRL(예: VLDL) 및 TRL 잔존물 흡수 및 제거를 억제하고, TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하고, 이에 의해 대상체의 혈액에서 트리글리세리드 수준을 증가시키는 기능을 한다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 간세포에 의한 TRL(예: VLDL) 및 TRL 잔존물 흡수 및 제거를 억제하는 ApoC3의 능력을 감소시킬 수 있거나, TRL(예: VLDL)의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해를 억제하는 ApoC3의 능력을 감소시킬 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체의 혈액에서 ApoC3의 활성을 억제시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, ApoC3의 활성을 간세포에 의한 TRL(예: VLDL)

및 TRL 잔존물 흡수 및 제거의 억제이다. 특정 실시형태에서, ApoC3의 활성은 TRL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해의 억제이다. 특정 실시형태에서, ApoC3의 활성은 간세포에 의한 TRL(예: VLDL) 및 TRL 잔존물 흡수 및 제거의 억제 및 TRL의 지질단백질 리파제-매개된 지방분해의 억제이다.

[0109] 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 제거 속도를 증가시키는데 유용하다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 혈액으로부터 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 제거 속도를 증가시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0110] 본원에 개시된 항-ApoC3 항체는 대상체의 혈액에서 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 감소시키는데 유용하다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체의 혈액에서 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은, 본원에 개시된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체의 혈액에서 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은, 본원에 개시된 방법 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 평가하는 경우, 대상체의 혈액에서 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준을 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 감소시킨다. 특정 실시형태에서, 대상체의 혈액에서 ApoC3 및/또는 ApoB(예: ApoB48 및/또는 ApoB100)의 수준 감소는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42 또는 48시간 동안 유지된다.

[0111] 개시된 항-ApoC3 항체는 대상체의 혈액에서 트리글리세리드 수준을 감소시키는데 유용하다. 따라서, 특정 실시 형태에서, 본 발명은 대상체의 혈액에서 트리글리세리드 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0112] 개시된 항-ApoC3 항체는 고트리글리세리드혈증의 치료에 유용하다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 고트리글리세리드혈증을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 카이로미크론혈증을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 카이로미크론혈증증후군을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0113] 개시된 항-ApoC3 항체는 대상체에서 식후 고지혈증의 치료 및 예방에 유용하다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 식후 고지혈증을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 항-ApoC3 항체는 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여할 수 있다.

[0114] 이론에 구속되는 것을 바라지 않지만, 본 출원인은, 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 항체가, 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여되는 경우, 대상체에서 식후 카이로미크론 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시킬 수 있을 것으로 생각한다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 식후 카이로미크론 또는 카이로미크론 잔존물의 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 항-ApoC3 항체는 식사 전, 식사 동안 또는 식사 후에 대상체에게 투여할 수 있다.

[0115] 고트리글리세리드혈증을 갖는 환자에서 혈액중 트리글리세리드 수준의 감소는 췌장염의 발증 위험을 감소시킬 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 고트리글리세리드혈증을 갖는 대상체에서 췌장염의 위험을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0116] 개시된 항-ApoC3 항체는 대상체에서 심혈관 질환의 위험을 감소시키는데 유용하다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 고트글리세리드혈증을 갖는 환자에서 심혈관 질환의 위험을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 개시된 유효량의 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포

함한다. 고트리글리세리드혈증 또는 과도한 식후 지방혈증과 연관되거나 이에 의해 유발된 임의의 심혈관 질환을 발증하는 위험은 본원에 개시된 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물의 투여에 의해 감소될 수 있다. 위험이 감소될 수 있는 심혈관 질환은, 제한 없이, 관상 동맥 질환, 아테롬성 동맥경화증, 협심증, 심근 경색 및 뇌졸중을 포함한다.

[0117] 본원에 개시된 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물은 단독으로 또는 추가의 치료제와 조합하여 투여할 수 있다. 특정 실시형태에서, 추가의 치료제는 또 다른 지질 저하제이다. 임의의 하나 이상의 지질 저하제는 본원에 개시된 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물과 조합하여 사용될 수 있다. 적합한 지질 저하제는, 제한 없이, HMG-CoA 리덕타제 억제제(예: 아토르바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 피타바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴 또는 심바스타틴), 피브레이트, 니아신, 담즙산 봉쇄제(예: 콜레스티르아민, 콜레스티풀 및 콜레세벨람), 식이 콜레스테롤 흡수의 억제제(예: 에제티미브), 마이크로좀 트리글리세리드 전이 단백질(MTP) 억제제(예: 로미타피드), 피토스테롤, 판토크레아틴 리파제 억제제(예: 오를리스타트), 콜레스테릴 에스테르 전이 단백질 억제제, 스쿠알렌 신타제 억제제(예: TAK-475, 자라고진산 및 RPR 107393), ApoA-1 Milano, 석시노부콜(AGI-1067), 아포단백질-B 억제제(예: Mipomersen), 프로단백질 전환 서브틸리신/크신 타입 9 (PCSK9) 억제제(예: 알리로쿠맙, 애볼로쿠맵 및 보코시주맵) 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 추가의 지질 저하제는 에제티미브 및 HMG-CoA 리덕타제 억제제의 조합이다. 특정 실시형태에서, 지질 저하제는 에제티미브, HMG-CoA 리덕타제 억제제 및 PCSK9 억제제의 조합이다.

[0118] 본원에 개시된 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물은 다양한 경로에 의해 대상체에게 전달될 수 있다. 이들은 비경구, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내 및 피하 경로를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체 또는 약제학적 조성물은 피하 또는 정맥내 전달된다.

[0119] 증상의 치료 또는 예방에 효과적일 수 있는 본원에 개시된 항-ApoC3 항체 또는 약제학적 조성물의 양은 질환의 성질에 의존하고, 표준 임상 기술에 의해 결정된다. 조성물에 사용되는 정확한 용량은 또한 투여 경로 및 이에 의해 유발된 감염 또는 질환의 중증도에 의존하고, 실시자의 판단 및 각 대상체의 상황에 따라 결정되어야 한다. 예를 들면, 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태(연령, 체중 및 건강을 포함), 환자가 인간 또는 동물인지의 여부, 기타 투여된 의약, 또는 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부에 따라 또한 달라질 수 있다. 치료 용량은 안전성 및 유효성을 최적화하기 위해 최적으로 조정된다.

[0120] 본원에 기재된 항-ApoC3 항체는, 면역검정을 포함하는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 고전적 면역조직학적 방법, 예를 들면, 효소 결합된 면역흡착 검정(ELISA), 면역침강 또는 웨스턴 블로팅을 사용하여 생물학적 샘플에서 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 단백질 수준을 검정하기 위해 또한 사용될 수 있다. 적합한 항체 검정 표지는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 효소 표지, 예를 들면, 글루코즈 옥시다제; 방사선동위체, 예를 들면, 요오드(¹²⁵I, ¹²¹I), 탄소(¹⁴C), 황(³⁵S), 트리튬(³H), 인듐(¹¹¹In) 및 테크네튬(⁹⁹Tc); 발광 표지, 예를 들면, 루미놀; 및 형광 표지, 예를 들면, 플루오레세인 및 로다민 및 비오틴을 포함한다. 이러한 표지는 본원에 기재된 항체를 표지하기 위해 사용될 수 있다. 또는, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 인식하는 제2 항체를 표지하고, 항-ApoC3 항체와 조합 사용하여 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 단백질 수준을 검출할 수 있다.

[0121] ApoC3(예: 인간 ApoC3) 단백질의 발현 수준에 대한 검정은, 제1 생물학적 샘플에서 직접(예를 들면, 절대 단백질 수준을 측정 또는 평가함으로써) 또는 상대적(예를 들면, 제2 생물학적 샘플에서 질환 연관된 단백질 수준과 비교함으로써)으로 제1 생물학적 샘플 중의 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 단백질의 수준을 정성적 또는 정량적으로 측정 또는 평가하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 제1 생물학적 샘플에서 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 폴리펩티드 발현 수준을 측정 또는 평가하고, 표준 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 단백질 수준과 비교할 수 있고, 표준은 질환을 갖지 않는 개체로부터 수득된 제2 생물학적 샘플로부터 채취하거나 질환을 갖지 않는 개체의 모집단으로부터의 평균 수준에 의해 결정된다. 당해 기술분야에서 이해되는 바와 같이, "표준" ApoC3(예: 인간 ApoC3) 폴리펩티드 수준이 공지되면, 이는 비교를 위한 표준으로서 반복적으로 사용될 수 있다.

[0122] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 샘플"은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)을 잠재적으로 발현하는 대상체, 세포주, 조직 또는 기타 세포 공급원으로부터 수득된 임의의 생물학적 샘플을 지칭한다. 동물(예: 인간)로부터 조직 생검물 및 체액을 수득하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 생물학적 샘플은 말초 단핵 혈액 세포를 포함한다.

[0123] 본원에 기재된 항-ApoC3 항체는, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되고 표준인 시험관내 및 생체내 적용을 포함하여 본원의 기재에 기초하여 예후적, 진단적, 모니터링 및 스크리닝 용도에 사용될 수 있다. 면역계 상태 또는 면역 반응의 시험관내 평가 및 사정을 위한 예후적, 진단적, 모니터링 및 스크리닝 검정 및 키트를

이용하여, 상승된 ApoC3 활성을 갖는 것으로 공지되거나 갖는 것으로 의심되는 것들을 포함하여 환자 샘플을 예측, 진단 및 모니터링하여 평가할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 항-ApoC3 항체는 생검 샘플의 면역조직화학에 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항-ApoC3 항체를 사용하여 ApoC3(예: 인간 ApoC3)의 수준을 검출할 수 있고, 이어서 이러한 수준을 특정한 질환 증상과 관련시킬 수 있다. 본원에 기재된 항-ApoC3 항체는 검출 가능한 또는 기능적 표지를 담지할 수 있다. 형광 표지가 사용되는 경우, 현재 이용가능한 현미경 및 형광-활성화된 세포 분류 분석(FACS) 또는 당해 기술분야에 공지된 양 방법 절차의 조합을 사용하여 특이적 결합 멤버를 동정 및 정량화할 수 있다. 본원에 기재된 항-ApoC3 항체는 형광 표지를 담지할 수 있다. 형광 표지의 예는, 예를 들면, 반응성 및 접합된 프로브, 예를 들면, 아미노쿠마린, 플루오레세인 및 텍사스 레드, 알렉사 플루오르 염료, Cy 염료 및 DyLight 염료를 포함한다. 항-ApoC3 항체는 방사성 표지, 예를 들면, 동위체 ^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 및 ^{186}Re 를 포함할 수 있다. 방사성 표지를 사용하는 경우, 당해 기술분야에 공지된 현재 이용가능한 계수 절차를 사용하여 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 대한 항-ApoC3 항체의 특이적 결합을 동정 및 정량화할 수 있다. 표지가 효소인 경우, 검출은 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 현재 이용되는 비색법, 분광광도법, 형광분광광도법, 전류측정 또는 위산측정 기술의 임의의 것에 의해 달성할 수 있다. 이는 항체 및 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 사이에 복합체의 형성을 가능하게 하는 조건하에 샘플 또는 대조군 샘플을 항-ApoC3 항체와 접촉시킴으로써 달성할 수 있다. 항체 및 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 사이에 형성된 임의의 복합체를 검출하고 샘플 및 대조군에서 비교한다. 또한, 본원에 기재된 항체를 사용하여 면역친화성 정제에 의해 ApoC3(예: 인간 ApoC3)을 정제할 수 있다. 또한, 본원에는, 예를 들면, ApoC3(예: 인간 ApoC3)의 존재 정도에 대한 정량적 분석을 위한 시험 키트의 형태로 제조될 수 있는 검정 시스템이 포함된다. 시험 키트의 시스템은 표지된 성분, 예를 들면, 표지된 ApoC3 항체 및 하나 이상의 추가의 면역화학 시약을 포함할 수 있다.

4. 약제학적 조성물

본원에는, 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 중에 목적하는 정도의 순도를 갖는 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA]. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 용량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 완충액, 예를 들면, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예를 들면, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머, 예를 들면, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 글루코즈, 만노즈 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들면, EDTA; 당, 예를 들면, 슈크로즈, 만니톨, 트레할로즈 또는 솔비톨; 염-형성 카운터-이온, 예를 들면, 나트륨; 금속 착물(예: Zn-단백질 착물); 또는 비이온성 계면활성제, 예를 들면, TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함한다.

특정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 중에 본원에 기재된 항-ApoC3 항체 및 임의로 하나 이상의 추가 예방적 또는 치료적 약제를 포함한다. 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 중에 유효량의 본원에 기재된 항체 및 임의로 하나 이상의 추가 예방적 또는 치료적 약제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항체는 약제학적 조성물에 포함된 유일한 활성 성분이다. 본원에 기재된 약제학적 조성물은 ApoC3 활성을 억제하고 증상, 예를 들면, 암 또는 감염성 질환을 치료하는데 유용할 수 있다.

비경구 제제에 사용된 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 비히클, 비수성 비히클, 항균제, 등장제, 완충제, 항산화제, 국소 마취제, 혼탁제 및 분산제, 유화제, 봉지제 또는 퀼레이트제 및 기타 약제학적으로 허용되는 물질을 포함한다. 수성 비히클의 예는 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 텍스트로즈 주사액, 멸균수 주사액, 텍스트로즈 및 락테이트화 링거 주사액을 포함한다. 비수성 비경구 비히클은 식물 기원의 비휘발성 오일, 면실유, 옥수수유, 참깨유 및 땅콩유를 포함한다. 정균성 또는 정진균성 농도의 항균제는 복수 용량 용기에 팩키징된 비경구 제제에 첨가될 수 있고, 이는 폐놀 또는 크레졸, 수은제, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤즈에토늄 클로라이드를 포함한다. 등장제는 염화나트륨 및 텍스트로즈를 포함한다. 완충제는 포스페이트 및 시트레이트를 포함한다. 항산화제는 중황산나트륨을 포함한다. 국소 마취제는 프로카인 하이드로클로라이드를 포함한다. 혼탁제 및 분산제

는 나트륨 카복시메틸셀룰로즈, 하이드록시프로필 메틸셀룰로즈 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 폴리솔베이트 80(TWEEN® 80)을 포함한다. 금속 이온의 봉지제 또는 킬레이트제는 EDTA를 포함한다. 약제학적 담체는 또한 수흔화성 비히클을 위한 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜; 및 pH 조정을 위한 수산화나트륨, 하이드로콜린산, 시트르산 또는 락트산을 포함한다.

[0128] 약제학적 조성물은 대상체에 대한 임의의 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다. 투여 경로의 구체적 예는 비강내, 경구, 폐내, 경피, 피내 및 비경구를 포함한다. 피하, 근육내 또는 정맥내 주사를 특징으로 하는 비경구 투여가 또한 본원에서 의도된다. 주사제는 액체 용액 또는 혼탁액, 주사 전에 액체에 용해 또는 혼탁시키기에 적합한 고체 형태, 또는 에멀젼으로서 종래의 형태로 제조할 수 있다. 주사제, 액제 및 에멀젼은 또한 하나 이상의 부형제를 함유한다. 적합한 부형제는, 예를 들면, 물, 식염수, 텍스트로즈, 글리세롤 또는 에탄올이다. 또한, 필요에 따라, 투여되는 약제학적 조성물은 또한 미량의 무독성 보조 물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 증강제 및 기타 이러한 제제, 예를 들면, 나트륨 아세테이트, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레아이트 및 사이클로덱스트린을 함유할 수 있다.

[0129] 항체의 비경구 투여를 위한 제제는 주사 준비가 된 멸균 용액, 멸균 건조 가용성 생성물, 예를 들면, 피하 정제를 포함하여, 사용 직전에 용매와의 조합 준비의 동결건조된 분말, 주사 준비의 멸균 혼탁제, 사용 직전에 비히클과의 조합 준비가 된 멸균 건조 불용성 생성물 및 멸균 에멀젼을 포함한다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0130] 정맥내 투여하는 경우, 적합한 담체는 생리학적 식염수 또는 인산염 완충된 식염수(PBS) 및 증점제 및 가용화제, 예를 들면, 글루코즈, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜 및 이들의 혼합물을 함유하는 용액을 포함한다.

[0131] 항체를 포함하는 국소 혼합물은 국소 및 전신 투여용으로 기재된 바와 같이 제조된다. 수득된 혼합물은 용액, 혼탁액, 에멀젼 등일 수 있고, 크림, 젤, 연고, 에멀젼, 용액, 엘리시르, 로션, 혼탁액, 텅크, 페이스트, 품, 에어로졸, 관주, 스프레이, 좌제, 밴드, 경피 패치 또는 국소 투여에 적합한 임의의 기타 제형일 수 있다.

[0132] 본원에 기재된 항-ApoC3 항체는, 예를 들면, 흡입에 의한 국소 적용을 위한 에어로졸로서 제형화될 수 있다[참조: 미국 특허 제4,044,126호, 제4,414,209호 및 제4,364,923호, 이는 염증 질환, 특히 천식의 치료에 유용한 스테로이드의 전달을 위한 에어로졸을 기재한다]. 기도에 투여하기 위한 이들 제형은, 단독으로 또는 락토즈 등의 불활성 담체와 조합하여, 에어로졸 또는 네뷸라이저용의 용액의 형태로, 또는 주입을 위한 미세 분말로서 존재할 수 있다. 이러한 경우에, 제형의 입자는, 한 가지 실시형태에서, 50 μm (micron) 미만의 직경, 한 가지 실시형태에서 10 μm 미만의 직경을 갖는다.

[0133] 본원에 기재된 항-ApoC3 항체는 국지 또는 국소 적용, 예를 들면, 젤, 크림 및 로션의 형태로, 피부 및 점막, 예를 들면, 눈에서 국소 적용을 위해, 및 대장내시경 또는 척수내 적용을 위해 제형화될 수 있다. 국소 투여는 경피 전달을 위해 및 또한 눈 또는 점막에의 투여를 위해, 또는 흡입 치료를 위해 의도된다. 항체 단독 또는 기타 약제학적으로 허용되는 부형제와 조합된 비강 용액이 또한 투여될 수 있다.

[0134] 이온도입 및 전기영동 장치를 포함하는 경피 패치는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있고, 항체를 투여하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 이러한 패치는 미국 특허 제6,267,983호, 제6,261,595호, 제6,256,533호, 제6,167,301호, 제6,024,975호, 제6,010715호, 제5,985,317호, 제5,983,134호, 제5,948,433호 및 제5,860,957호에 개시되어 있다.

[0135] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 것을 포함하는 약제학적 조성물은 동결건조된 분말이고, 이는 용액, 에멀젼 및 기타 혼합물로서 투여하기 위해 재구성될 수 있다. 이는 또한 고체 또는 젤로서 재구성 및 제형화될 수 있다. 동결건조된 분말은 본원에 기재된 항체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 유도체를 적합한 용매에 용해시켜 제조한다. 일부 실시형태에서, 동결건조된 분말은 무균이다. 용매는 분말, 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 기타 약리학적 성분을 개선시키는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 텍스트로즈, 솔비톨, 프리토즈, 옥수수 시럽, 크실리톨, 글리세린, 글루코즈, 슈크로즈 또는 기타 적합한 제제를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 용매는 또한 완충제, 예를 들면, 시트레이트, 나트륨 또는 칼륨 포스페이트 또는, 한 가지 실시형태에서, 대략 중성 pH에서 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 기타 이러한 완충제를 함유할 수 있다. 용액의 후속 멸균 여과, 이어서 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 표준 조건하의 동결건조는 목적하는 제형을 제공한다. 한 가지 실시형태에서, 수득되는 용액은 동결건조를 위한 바이알에 분배된다. 각각의 바이알은 단일 용량 또는 다중 용량의 화합물을 함유한다. 동결건조된 분말은 적절한 조건, 예를 들면,

약 4°C 내지 실온에서 저장될 수 있다. 주사용수를 사용한 이러한 동결건조된 분말의 재구성은 비경구 투여에 사용하기 위한 제형을 제공한다. 재구성을 위해, 동결건조된 분말을 멸균수 또는 기타 적합한 담체에 첨가한다. 정확한 양은 선택된 화합물에 의존한다. 이러한 양은 경험적으로 결정될 수 있다.

[0136] 본원에 기재된 항-ApoC3 항체 및 본원에 제공된 기타 조성물은 또한 치료되는 대상체의 신체의 특정 조직, 수용체 또는 다른 부분으로 표적화되도록 제형화할 수 있다. 다수의 이러한 표적화 방법은 당해 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 이러한 모든 표적화 방법은 본 조성물에서 사용하기 위해 본원에서 의도된다. 표적화 방법의 비-제한적 예에 대해서는, 예를 들면, 문헌[참조: 미국 특허 제6,316,652호, 제6,274,552호, 제6,271,359호, 제6,253,872호, 제6,139,865호, 제6,131,570호, 제6,120,751호, 제6,071,495호, 제6,060,082호, 제6,048,736호, 제6,039,975호, 제6,004,534호, 제5,985,307호, 제5,972,366호, 제5,900,252호, 제5,840,674호, 제5,759,542호 및 제5,709,874호]을 참조한다.

[0137] 생체내 투여를 위해 사용되는 조성물은 무균성일 수 있다. 이는, 예를 들면, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

5. 폴리뉴클레오티드, 백터 및 항-ApoC3 항체를 생산하는 방법

[0139] 또 다른 양태에서, 본원에는, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(예: 경쇄 가변 영역 또는 중쇄 가변 영역)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 백터, 예를 들면, 숙주 세포(예: 이. 콜라이(*E. coli*) 및 포유동물 세포)에서 재조합 발현을 위해 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터가 제공된다.

[0140] 본원에 사용된 바와 같이, "단리된" 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 분자는 핵산 분자의 천연 공급원(예: 마우스 또는 인간에서)에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리되는 것이다. 더욱이, "단리된" 핵산 분자, 예를 들면, cDNA 분자는, 재조합 기술에 의해 생산되는 경우, 기타 세포 물질 또는 배양 배지를 실질적으로 포함하지 않거나, 화학적으로 합성되는 경우, 화학적 전구체 또는 기타 화학물질을 실질적으로 포함하지 않을 수 있다. 예를 들면, 어구 "실질적으로 포함하지 않는"은, 약 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1% 미만(특히 약 10% 미만)의 다른 물질, 예를 들면, 세포 물질, 배양 배지, 기타 핵산 분자, 화학적 전구체 또는 기타 화학물질을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 분자의 제제를 포함한다. 구체적 실시형태에서, 본원에 기재된 항체를 코딩하는 핵산 분자(들)는 단리되거나 정제된다.

[0141] 특정 양태에서, 본원에는, ApoC3(예: 인간 ApoC3) 폴리펩티드에 특이적으로 결합하고 본원에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 항체, 뿐만 아니라 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 폴리펩티드(예를 들면, 용량-의존적 방식으로)에 결합하기 위해 이러한 항체와 경쟁하거나 이러한 항체의 것과 동일한 애피토프에 결합하는 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.

[0142] 특정 양태에서, 본원에는 본원에 기재된 항체의 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 항체의 VH, VL 또는 CDR(예를 들면, 본원의 표 1 내지 4 참조)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0143] 또한, 본원에는, 예를 들면, 코돈/RNA 최적화, 이종성 신호 서열로의 치환 및 mRNA 불안정성 요소의 제거에 의해 최적화되는 항-ApoC3 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 코돈 변화를 도입하거나 mRNA 중의 억제 영역을 제거함으로써 재조합 발현을 위한 항-ApoC3 항체(예: 경쇄, 중쇄, VH 도메인 또는 VL 도메인)를 코딩하는 최적화된 핵산을 생성하는 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: 미국 특허 제5,965,726호; 제6,174,666호; 제6,291,664호; 제6,414,132호; 및 제6,794,498호]에 기재된 최적화 방법을 적용함으로써 수행할 수 있다. 예를 들면, RNA 내의 잠재적 스플라이싱 부위 및 불안정성 요소(예: A/T 또는 A/U 풍부 요소)는 재조합 발현을 위한 RNA의 안정성을 증가시키기 위해 핵산 서열에 의해 코딩된 아미노산을 변경하지 않고서 돌연변이시킬 수 있다. 변경은, 예를 들면, 동일한 아미노산에 대한 대체 코돈을 사용하여 유전자 코드의 축퇴를 이용한다. 일부 실시 형태에서, 보존적 돌연변이, 예를 들면, 본래 아미노산과 유사한 화학적 구조 및 성질 또는 기능을 갖는 유사한 아미노산을 코딩하도록 하나 이상의 코돈을 변경하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 방법은 최적화되지 않은 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 항-ApoC3 항체의 발현과 비교하여 항-ApoC3의 발현을 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 이상 증가시킬 수 있다.

[0144] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 최적화된 폴리뉴클레오티드 서열(예: VL 도메인 또는 VH 도메인)은 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 최적화되지 않은 폴리뉴클레오티드 서열(예: VL 도메인 또는 VH 도메인)의 안티센스(예: 상보성) 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 최적화된 뉴클레오티드 서열 또는 단편은, 고도로 염격한 조건하

예, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 최적화되지 않은 폴리뉴클레오티드 서열의 안티센스 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화한다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 최적화된 뉴클레오티드 서열은, 고도로 염격한, 중간 또는 보다 낮게 염격한 하이브리드화 조건하에, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 코딩하는 최적화되지 않은 뉴클레오티드 서열의 안티센스 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화한다. 하이브리드화 조건에 관한 정보는, 예를 들면, 문헌[참조: 미국 특허출원 공개번호 제2005/0048549호(예: 문단번호 72-73), 이는 본원에서 참조로서 도입된다.]에 기재되어 있다.

[0145] 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 폴리뉴클레오티드를 수득하고 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 결정할 수 있다. 본원에 기재된 항체, 예를 들면, 표 1에 기재된 항체 및 이들 항체의 변형된 버전을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 당해 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 결정할 수 있고, 즉 특정 아미노산을 코딩하는 것으로 공지된 뉴클레오티드 코돈은 항체를 코딩하는 핵산을 생성하도록 하는 방식으로 조립된다. 항체를 코딩하는 이러한 폴리뉴클레오티드는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드(예를 들면, 문헌[참조: Kutmeier G et al., (1994), BioTechniques 17: 242-6]에 기재된 바와 같이)로부터 조립할 수 있고, 요약하면, 이는 항체를 코딩하는 서열의 일부를 함유하는 중첩 올리고뉴클레오티드의 합성, 이들 올리고뉴클레오티드의 어닐링 및 결찰, 및 이어서 PCR에 의한 결찰된 올리고뉴클레오티드의 증폭을 포함한다.

[0146] 또는, 본원에 기재된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지된 방법(예를 들면, PCR 및 기타 분자 클로닝 방법)을 사용하여 적합한 공급원(예: 하이브리도마)의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 예를 들면, 공지된 서열의 3' 및 5' 말단에 하이브리드화 가능한 합성 프라이머를 사용한 PCR 증폭은 목적하는 항체를 생성하는 하이브리도마 세포로부터 수득된 게놈 DNA를 사용하여 실시할 수 있다. 이러한 PCR 증폭 방법을 사용하여, 항체의 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 수득할 수 있다. 이러한 PCR 증폭 방법을 사용하여, 항체의 가변 경쇄 영역 또는 가변 중쇄 영역을 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 수득할 수 있다. 증폭된 핵산은, 예를 들면, 숙주 세포에서의 발현 및 추가의 클로닝을 위해 벡터로 클로닝하여, 키메라 및 인간화된 항체를 생성할 수 있다.

[0147] 특정 항체를 코딩하는 핵산을 함유하는 클론이 이용가능하지 않지만 항체 분자의 서열이 공지되어 있는 경우, 면역글로불린을 코딩하는 핵산은 화학적으로 합성하거나, 서열의 3' 및 5' 말단과 하이브리드화 가능한 합성 프라이머를 사용한 PCR 증폭에 의해 또는, 특정 유전자 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 클로닝하여, 예를 들면, 항체를 코딩하는 cDNA 라이브러리로부터 cDNA 클론을 동정함으로써, 적합한 공급원(예를 들면, 항체를 발현하는 임의의 조직 또는 세포로부터 생성된 항체 cDNA 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리, 또는 이들로부터 단리된 핵산, 바람직하게는 폴리 A+ RNA, 예를 들면, 본원에 기재된 항체를 발현하도록 선택된 하이브리도마 세포)으로부터 수득할 수 있다. 이어서, PCR에 의해 생성된 증폭된 핵산은 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 복제가능한 클로닝 벡터에 클로닝할 수 있다.

[0148] 본원에 기재된 항-ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 사용하여 용이하게 단리 및 서열분석할 수 있다(예를 들면, 항-ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써). 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로서 작용할 수 있다. 단리되면, DNA를 발현 벡터에 위치시키고, 이어서 이. 콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들면, CHO GS SystemTM(Lonza)), 또는 달리는 면역글로불린 단백질을 생성하지 않는 콜수종 세포 등의 숙주 세포로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 항-ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항체의 합성을 수득할 수 있다.

[0149] 완전한 항체를 생성하기 위해, 제한 부위를 보호하도록, VH 또는 VL 뉴클레오티드 서열, 제한 부위 및 플랭킹 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 scFv 클론 중의 VH 또는 VL 서열을 증폭시킬 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 클로닝 기술을 사용하여, PCR 증폭된 VH 도메인은 중쇄 불변 영역, 예를 들면, 인간 감마 4 불변 영역을 발현하는 벡터에 클로닝시키고, PCR 증폭된 VL 도메인은 경쇄 불변 영역, 예를 들면, 인간 카파 또는 람다 불변 영역을 발현하는 벡터에 클로닝시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, VH 또는 VL 도메인을 발현시키기 위한 벡터는 EF-1 α 프로모터, 분비 신호, 가변 영역을 위한 클로닝 부위, 불변 도메인 및 네오마이신 등의 선택 마커를 포함한다. 또한, VH 및 VL 도메인은 필요한 불변 영역을 발현시키는 하나의 벡터에 클로닝할 수 있다. 이어서, 중쇄 전환 벡터 및 경쇄 전환 벡터를 세포주에 동시-형질감염시켜, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 기술을 사용하여, 전장 항체, 예를 들면, IgG를 발현하는 안정한 또는 일시적 세포주를 생성한다.

[0150] 또한, DNA는, 예를 들면, 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인의 코딩 서열을 치환함으로써 또는 비-면역글로불린 폴리펩ти드의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써

변형시킬 수 있다.

[0151] 또한, 고도로 염격한, 중간 또는 보다 낮게 염격한 하이브리드화 조건하에, 본원에 기재된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는, 고도 염격한, 중간 또는 보다 낮은 염격한 하이브리드화 조건하에, 본원에 제공된 VH 도메인 또는 VL 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 하이브리드화한다.

[0152] 하이브리드화 조건은 당해 기술분야에 기재되어 있고, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 예를 들면, 염격한 조건하의 하이브리드화는 약 45°C에서 6×염화나트륨/나트륨 시트레이트(SSC)에서 필터-결합된 DNA와의 하이브리드화, 이어서 약 50 내지 65°C에서 0.2×SSC/0.1% SDS에서 1회 이상의 세척을 포함하고; 고도로 염격한 조건하의 하이브리드화는 약 45°C에서 6×SSC에서 필터-결합된 핵산과의 하이브리드화, 이어서 약 68°C에서 0.1×SSC/0.2% SDS에서 1회 이상의 세척을 포함한다. 다른 염격한 하이브리드화 조건하의 하이브리드화는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[참조: Ausubel FM *et al.*, eds., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York at pages 6.3.1-6.3.6 and 2.10.3]에 기재되어 있다.

[0153] 특정 양태에서, 본원에는, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 항체를 (예를 들면, 재조합적으로) 발현하는 세포(예: 숙주 세포) 및 관련 폴리뉴클레오티드 및 발현 백터가 제공된다. 본원에는, 숙주 세포, 바람직하게는 포유동물 세포에서 재조합 발현을 위해 항-ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항체 또는 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터(예: 발현 백터)가 제공된다. 또한, 본원에는, 본원에 기재된 항-ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항체(예: 인간 또는 인간화된 항체)를 재조합적으로 발현시키기 위한 이러한 백터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 양태에서, 본원에는, 숙주 세포로부터 이러한 항체를 발현시키는 것을 포함하는, 본원에 기재된 항체를 생산하는 방법이 제공된다.

[0154] ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 항체(예: 전장 항체, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 본원에 기재된 단일쇄 항체)의 재조합 발현은 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 발현 백터의 작제를 포함한다. 본원에 기재된 항체 분자, 항체의 중쇄 또는 경쇄(예: 중쇄 또는 경쇄 가변 영역)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 수득되는 경우, 항체 분자를 생산하기 위한 백터는 당해 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 생성할 수 있다. 따라서, 뉴클레오티드 서열을 코딩하는 항체 또는 항체 단편(예: 경쇄 또는 중쇄)을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킴으로써 단백질을 제조하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법을 사용하여, 항체 또는 항체 단편(예: 경쇄 또는 중쇄) 코딩 서열 및 적절한 전사 및 번역 조절 신호를 함유하는 발현 백터를 작제할 수 있다. 이들 방법은, 예를 들면, 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 또한, 본원에 기재된 항체 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역, 또는 프로모터에 작동적으로 연결된 중쇄 또는 경쇄 CDR을 포함하는 복제가능한 백터가 제공된다. 이러한 백터는, 예를 들면, 항체 분자의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있고[참조: 국제공개공보 제WO 86/05807호 및 제WO 89/01036호; 및 미국 특허 제5,122,464호], 항체의 가변 영역은 전체 중쇄, 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄 및 경쇄 둘 다의 발현을 위한 이러한 백터에 클로닝될 수 있다.

[0155] 발현 백터는 종래의 기술에 의해 세포(예: 숙주 세포)에 도입될 수 있고, 이어서 수득되는 세포는 본원에 기재된 항체를 생산하기 위해 종래의 기술에 의해 배양할 수 있다. 따라서, 본원에는, 숙주 세포에서 이러한 서열의 발현을 위해 프로모터에 작동적으로 연결된, 본원에 기재된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 단편, 또는 본원에 기재된 일본쇄 항체를 함유하는 숙주 세포가 제공된다. 특정 실시형태에서, 일본쇄 항체의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄 둘 다를 개별적으로 코딩하는 백터는 하기 상세된 바와 같이 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 동시-발현시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 본원에 기재된 항체의 중쇄 및 경쇄 둘 다를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백터를 함유한다. 특정 실시형태에서, 숙주 세포는 2개의 상이한 백터를 함유하고, 제1 백터는 본원에 기재된 항체의 중쇄 또는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편을 포함하고, 제2 백터는 본원에 기재된 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편을 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 숙주 세포는 본원에 기재된 항체의 중쇄 또는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편을 포함하는 제1 백터를 포함하고, 제2 숙주 세포는 본원에 기재된 항체의 경쇄 또는 경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 백터를 포함한다. 특정 실시형태에서, 제1 세포에 의해 발현된 중쇄/중쇄 가변 영역은 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 형성하기 위해 제2 세포의 경쇄/경쇄 가변 영역과 회합된다. 특정 실시형태에서, 본원에는, 이러한 제1 숙주 세포 및 이러한 제2 숙주 세포를 포함하는 숙주 세포의 모집단이 제공된

다.

[0156] 특정 실시형태에서, 본원에는, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체의 경쇄/경쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 벡터, 및 본원에 기재된 항-ApoC3 항체의 중쇄/중쇄 가변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 벡터를 포함하는 벡터의 모집단이 제공된다.

[0157] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 사용하여, 본원에 기재된 항체 분자를 발현시킬 수 있다(참조: 미국 특허 제 5,807,715호). 이러한 숙주-발현 시스템은 목적하는 코딩 서열이 생성되고 후속적으로 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 또한, 적절한 뉴클레오티드 코딩 서열로 형질전환 또는 형질감염되는 경우, 본원에 기재된 항체 분자를 원위치에서 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은 미생물, 예를 들면, 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균(예: 이. 콜라이 및 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모(예: 사카로마이세스 퍼키아(*Saccharomyces Pichia*)); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예: 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예: 꽃양배추 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염되거나, 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예: Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템(예: 녹조류, 예를 들면, 클라미도모나스 레인하르티아(*Chlamydomonas reinhardtii*)); 또는 포유동물 세포의 게놈(예: 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스(예: 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)로부터 유래된 프로모터를 함유하는 재조합 발현 작제물을 포함하는 포유동물 세포 시스템(예를 들면, COS(예를 들면, COS1 또는 COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa 및 NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 및 BMT10 세포)을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체를 발현시키기 위한 세포는 CHO 세포, 예를 들면, CHO GS SystemTM(Lonza)로부터의 CHO 세포이다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체를 발현시키기 위한 세포는 인간 세포, 예를 들면, 인간 세포주이다. 특정 실시형태에서, 포유동물 발현 벡터는 pOptiVecTM 또는 pcDNA3.3이다. 특정 실시형태에서, 특히 전체 재조합 항체 분자를 발현시키기 위한, 세균 세포, 예를 들면, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 또는 진핵생물 세포(예: 포유동물 세포)가 재조합 항체 분자의 발현을 위해 사용된다. 예를 들면, 인간 메갈로바이러스로부터의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소 등의 벡터와 함께, 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포 등의 포유동물 세포는 항체를 위한 효과적인 발현 시스템이다[참조: Foecking MK & Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-5; 및 Cockett MI et al., (1990) Biotechnology 8(7): 662-7]. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 CHO 세포 또는 NS0 세포에 의해 생산된다. 특정 실시형태에서, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 발현은 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 의해 조절된다.

[0158] 세균 시스템에서, 다수의 발현 시스템은 발현되는 항체 분자를 위해 의도된 용도에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 다양한 이러한 항체가 생성되어야 하는 경우, 항체 분자의 약제학적 조성물의 생성을 위해, 용이하게 정제되는 고도의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는, 융합 단백질이 생성되도록 항체 코딩 서열이 lac Z 코딩 영역과 프레임 내에서 벡터에 개별적으로 결찰될 수 있는 이. 콜라이 발현 벡터 pUR278[참조: Ruether U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794]; pIN 벡터[참조: Inouye S & Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509] 등을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 예를 들면, pGEX 벡터를 또한 사용하여 글루타티온 5-트랜스퍼라제(GST)와의 융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 흡착 및 매트릭스 글루타티온 아가로즈 비드에 대한 결합, 이어서 유리 글루타티온의 존재하에 용출에 의해 용해된 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는, 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0159] 곤충 시스템에서, 예를 들면, 오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) 핵 다각체병 바이러스(AcNPV)는 외래 유전자를 발현시키기 위해 벡터로서 사용될 수 있다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 코딩 서열은 바이러스의 비-필수 영역(예를 들면, 폴리헤드린 유전자) 내로 개별적으로 클로닝시키고, AcNPV 프로모터(예를 들면, 폴리헤드린 프로모터)의 조절하에 위치시킬 수 있다.

[0160] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기반 발현 시스템을 이용할 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로

서 사용되는 경우, 목적하는 항체 코딩 서열을 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예를 들면, 후기 프로모터 및 3부분 리더 서열에 결찰시킬 수 있다. 이어서, 이러한 키메라 유전자를 시험판내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈 내에 삽입할 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역(예: 영역 E1 또는 E3) 내의 삽입은, 생존가능하고 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 생성한다[참조: Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9]. 또한, 특정의 개시 신호가 삽입된 항체 코딩 서열의 번역에 요구될 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 추가로, 개시 코돈은 전체 삽입체의 번역을 보장하기 위해 목적하는 코딩 서열의 판독 프레임과 일치해야 한다. 이들 외인성 번역 조절 신호 및 개시 코돈은 다양한 기원, 즉 천연 및 합성의 것일 수 있다. 발현 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 터미네이터 등을 포함시킴으로써 증강될 수 있다[참조: Bitter G *et al.*, (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544].

[0161] 또한, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 필요한 특정 방식으로 유전자 생성물을 변형 및 처리하는 숙주 세포 균주가 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형(예: 글리코실화) 및 처리(예: 절단)는 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 번역후 처리 및 변형을 위해 특징적 및 특이적 메카니즘을 갖는다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 처리를 보장하도록 선택할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 일차 전사물의 적절한 처리, 유전자 생성물의 글리코실화 및 포스포릴화를 위한 세포 기구를 보유하는 진핵생물 숙주 세포를 사용할 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는 CHO, VERO, BHK, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NS0(내인적으로 어떠한 면역글로불린 쇄를 생성하지 않는 뮤린 골수종 세포주), CRL7030, COS(예: COS1 또는 COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 및 HsS78Bst 세포를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항-ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항체는 포유동물 세포, 예를 들면, CHO 세포에서 생성된다.

[0162] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 감소된 푸코즈 함량을 갖거나 푸코즈 함량이 없다. 이러한 항체는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들면, 항체는 푸코실화하는 능력을 결여하거나 결핍하는 세포에서 발현시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, α 1,6-푸코실트랜스퍼라제의 양 대립인자의 녹아웃을 갖는 세포주를 사용하여 감소된 푸코즈 함량을 갖는 항체를 생산할 수 있다. Potelligent® 시스템(Lonza)은 감소된 푸코즈 함량을 갖는 항체를 생산하는데 사용될 수 있는 이러한 시스템의 일례이다.

[0163] 재조합 단백질의 장기간, 고수율 생산을 위해, 적합한 발현 세포를 생성할 수 있다. 예를 들면, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 안정하게 발현하는 세포주를 조작할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 제공된 세포는, 본원에 기재된 항체를 형성하기 위해 회합하는 경쇄/경쇄 가변 영역 및 중쇄/중쇄 가변 영역을 안정하게 발현한다.

[0164] 특정 양태에서, 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하기 보다도, 숙주 세포는 적절한 발현 조절 요소(예: 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 터미네이터, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택가능한 마커에 의해 조절된 DNA로 형질전환시킬 수 있다. 외래 DNA/폴리뉴클레오티드의 도입 후, 조작된 세포를 풍부화된 배지에서 1 내지 2일 동안 성장시킨 다음, 선택 배지로 스위칭한다. 재조합 플라스미드 중의 선택가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 이들의 염색체로 안정적으로 통합하고 성장하여 병소를 형성하는 것을 가능하게 하고, 이는 이어서 클로닝되어 세포주로 확장될 수 있다. 이 방법은, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체를 발현하는 세포주를 조작하기 위해 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 조작된 세포주는, 항체 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0165] 다수의 선택 시스템을 사용할 수 있고, 각각 tk-, hgprt- 또는 aprt-세포에서 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제[참조: Wigler M *et al.*, (1977) Cell 11(1): 223-32], 하이포크산틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제[참조: Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034] 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제[참조: Lowy I *et al.*, (1980) Cell 22(3): 817-23] 유전자를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 또한, 대사길항물질 내성을 하기 유전자에 대한 선택의 기초로서 사용할 수 있다: 메토트렉세이트에 내성을 부여하는 dhfr[참조: Wigler M *et al.*, (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K *et al.*, (1981) PNAS 78: 1527-31]; 마이코페놀산에 내성을 부여하는 gpt[참조: Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6]; 아미노글리코사이드 G-418에 내성을 부여하는 neo[참조: Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; 및 Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5]; 및 하이드로마이신에 내성을 부여하는 hygro[참조: Santerre RF *et al.*, (1984) Gene 30(1-3): 147-

56]. 재조합 DNA 기술의 분야에서 일반적으로 공지된 방법은 목적하는 재조합 클론을 선택하기 위해 통상적으로 적용할 수 있고, 이러한 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: Ausubel FM *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); 및 in Chapters 12 and 13, Dracopoli NC *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbere-Garapin F *et al.*, (1981) *J Mol Biol* 150: 1-14]에 기재되어 있고, 이는 이들의 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.

[0166] 항체 분자의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가시킬 수 있다[총설에 대해서는 문헌[참조: Bebbington CR & Hentschel CCG, DNA 클로닝시에 포유동물 세포에서 클로닝된 유전자의 발현을 위해 유전자 증폭에 기반한 벡터의 사용, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)] 참조]. 항체를 발현하는 벡터 시스템 중의 마커가 증폭 가능한 경우, 숙주 세포의 배양물 중에 존재하는 억제제 수준의 증가는 마커 유전자의 카피 수를 증가시킨다. 증폭된 영역은 항체 유전자와 관련되기 때문에, 항체의 생산도 또한 증가할 것이다[참조: Crouse GF *et al.*, (1983) *Mol Cell Biol* 3: 257-66].

[0167] 숙주 세포는 본원에 기재된 2개 이상의 발현 벡터로 동시-형질감염시킬 수 있고, 제1 벡터는 중쇄 유래된 폴리펩티드를 코딩하고, 제2 벡터는 경쇄 유래된 폴리펩티드를 코딩한다. 2개 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 동등한 발현을 가능하게 하는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 숙주 세포는 상이한 양의 2개 이상의 발현 벡터로 동시-형질감염시킬 수 있다. 예를 들면, 숙주 세포는 하기 비율의 제1 발현 벡터 및 제2 발현 벡터의 어느 하나로 형질감염시킬 수 있다: 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 또는 1:50.

[0168] 또는, 단일 벡터를 사용할 수 있고, 이는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 둘 다를 코딩하고 발현시킬 수 있다. 이러한 상황에서, 과도한 독성 유리 중쇄를 회피하기 위해 경쇄를 중쇄의 전에 위치시켜야 한다[참조: Proudfoot NJ (1986) *Nature* 322: 562-565; 및 Kohler G (1980) *PNAS* 77: 2197-2199]. 중쇄 및 경쇄를 위한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다. 발현 벡터는 모노시스트론성(monocistronic) 또는 멀티시스트론성(multicistronic)일 수 있다. 멀티시스트론성 핵산 작제물은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상, 또는 2-5, 5-10 또는 10-20 유전자/뉴클레오티드 서열의 범위에서 코딩할 수 있다. 예를 들면, 바이시스트론성 핵산 작제물은 하기 순서로 프로모터, 제1 유전자(예를 들면, 본원에 기재된 항체의 중쇄) 및 제2 유전자(예를 들면, 본원에 기재된 항체의 경쇄)를 포함할 수 있다. 이러한 발현 벡터에서, 양 유전자의 전사는 프로모터에 의해 유도될 수 있는 반면, 제1 유전자로부터 mRNA의 번역은 캡-의존성 스캐닝 메카니즘에 의해 수행되고, 제2 유전자로부터 mRNA의 번역은 캡-독립적 메카니즘, 예를 들면, IRES에 의해 수행될 수 있다.

[0169] 본원에 기재된 항체 분자가 재조합 발현에 의해 생산되는 경우, 이는 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 크로마토그래피(예: 이온 교환, 친화성, 특히 단백질 A 및 크기 컬럼 크로마토그래피 후의 특이적 항원에 대한 친화성), 원심분리, 차별 용해도, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 기타 표준 기술에 의해 정제할 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 항체는 본원에 기재되거나 달리는 당해 기술분야에 공지된 이종성 폴리펩티드 서열과 융합하여 정제를 용이하게 할 수 있다.

[0170] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 단리되거나 정제된다. 일반적으로, 단리된 항체는, 단리된 항체와는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체를 실질적으로 포함하지 않는 것이다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체의 제조는 세포 물질 또는 화학적 전구체를 실질적으로 포함하지 않는다. 어구 "항체 물질을 실질적으로 포함하지 않는"은, 항체가 단리되거나 재조합에 의해 생산되는 세포의 세포 성분으로부터 분리되어 있는 항체의 제제를 포함한다. 따라서, 세포 물질을 실질적으로 포함하지 않는 항체는 약 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1%(건조 중량으로) 미만의 이종성 단백질(또한 본원에서 "오염 단백질"로서 지칭됨) 또는 항체의 변이체, 예를 들면, 상이한 번역후 변형된 형태의 항체 또는 기타 상이한 버전의 항체(예: 항체 단편)를 갖는 항체의 제제를 포함한다. 항체가 재조합에 의해 생성되는 경우, 이는 또한 일반적으로 배양 배지를 실질적으로 포함하지 않고, 즉 배양 배지는 단백질 제제 용적의 약 20%, 10%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1% 미만을 나타낸다. 항체가 화학적 합성에 의해 생산되는 경우, 이는 일반적으로 화학적 전구체 또는 기타 화학물질을 실질적으로 포함하지 않고, 즉 이는 단백질의 합성에 관여하는 화학적 전구체 또는 기타 화학물질로부터 분리된다. 따라서, 항체의 이러한 제제는 목적하는 항체 이외에 약 30%, 20%, 10% 또는 5%(건조 중량으로) 미만의 화학적 전구체 또는 화합물을 갖는다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는 단리되거나 정제된다.

[0171] ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 항체는 항체의 합성을 위해 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들면, 화학적 합성 또는 재조합 발현 기술에 의해 생산될 수 있다. 본원에 기재된 방법은, 달리 지

시하지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 유전자 분석, 재조합 DNA, 유기 화학, 생화학, PCR, 올리고뉴클레오티드 합성 및 변형, 핵산 하이브리드화 및 당해 기술분야의 관련 분야를 이용한다. 이를 기술은, 예를 들면, 본원에 인용된 참조문헌에 기재되어 있고, 문헌에 충분히 설명되어 있다[참조: Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press].

[0172] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항체는, 예를 들면, DNA 서열의 합성, 유전자 조작에 의한 생성을 포함하는 임의의 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체(예: 재조합 항체)이다. 특정 실시형태에서, 이러한 항체는 생체내에서 동물 또는 포유동물(예: 인간)의 항체 생식계열 레퍼토리 내에 천연으로 존재하지 않는 서열(예: DNA 서열 또는 아미노산 서열)을 포함한다.

[0173] 한 가지 양태에서, 본원에는, 본원에 기재된 세포 또는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 특정 양태에서, 본원에는, 본원에 기재된 세포 또는 숙주 세포(예를 들면, 본원에 기재된 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포 또는 숙주 세포)를 사용하여 항체를 발현(예를 들면, 재조합에 의한 발현)시키는 것을 포함하는, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 세포는 단리된 세포이다. 특정 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오티드는 세포 내로 도입된다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 세포 또는 숙주 세포로부터 수득된 항체를 정제하는 단계를 추가로 포함한다.

[0174] 폴리클로날 항체를 생산하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Chapter 11 in: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York].

[0175] 모노클로날 항체는, 하이브리도마, 재조합체 및 과지 디스플레이 기술 또는 이들의 조합의 사용을 포함하는 당해 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 모노클로날 항체는, 당해 기술분야에 공지되고, 예를 들면, 문헌[참조: Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981)]에 교시된 것들을 포함하는 하이브리도마 기술을 사용하여 생산할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체로 한정되지 않는다. 예를 들면, 모노클로날 항체는 본원에 기재된 항체, 예를 들면, 이러한 항체의 경쇄 또는 중쇄를 외인적으로 발현하는 숙주 세포로부터 재조합에 의해 생산할 수 있다.

[0176] 특정한 실시형태에서, 본원에 사용된 "모노클로날 항체"는 단일 세포(예: 재조합 항체를 생산하는 하이브리도마 또는 숙주 세포)에 의해 생산된 항체이고, 여기서 항체는, 예를 들면, 당해 기술분야에 공지되거나 본원의 실시예에 제공된 ELISA 또는 기타 항원-결합 또는 경쟁 결합 검정에 의해 측정하는 경우, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시형태에서, 모노클로날 항체는 키메라 항체 또는 인간화된 항체일 수 있다. 특정 실시형태에서, 모노클로날 항체는 일가 항체 또는 다가(예: 이가) 항체이다. 특정 실시형태에서, 모노클로날 항체는 단일특이적 또는 다중특이적 항체(예: 이중특이적 항체)이다. 본원에 기재된 모노클로날 항체는, 예를 들면, 문헌[참조: Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495]에 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조할 수 있거나, 예를 들면, 본원에 기재된 기술을 사용하여 과지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 물론 세포주 및 이에 의해 발현된 모노클로날 항체를 제조하는 다른 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Chapter 11 in: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, *supra*].

[0177] 하이브리도마 기술을 사용하여 특이적 항체를 생산 및 스크리닝하는 방법은 통상적이고 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예를 들면, 양, 염소, 래빗, 랙트, 햄스터 또는 마카크 원숭이를 면역화하여, 면역화에 사용된 단백질(예: ApoC3(예: 인간 ApoC3))에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 또는, 림프구는 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 림프구는 적합한 융합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마 세포를 형성한다[참조: Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and*

Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]. 추가로, RIMMS(반복 면역 다중 부위) 기술을 사용하여 동물을 면역화시킬 수 있다[참조: Kilpatrick KE *et al.*, (1997) Hybridoma 16:381-9, 이의 전체가 참조로서 도입됨].

[0178] 일부 실시형태에서, 마우스(또는 기타 동물, 예를 들면, 랙트, 원숭이, 당나귀, 돼지, 양, 햄스터 또는 개)를 항원(예: ApoC3(예: 인간 ApoC3))으로 면역화시키고, 면역 반응이 검출되면, 예를 들면, 항원에 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되면, 마우스 비장을 수거하고 비장세포를 단리한다. 이어서, 비장세포를 공지된 기술에 의해 임의의 적합한 골수종 세포, 예를 들면, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(The American Type Culture Collection(ATCC®))(Manassas, VA)으로부터 입수 가능한 세포주 SP20으로부터의 세포와 융합시켜 하이브리도마를 형성한다. 하이브리도마를 제한 희석에 의해 선택 및 클로닝한다. 특정 실시형태에서, 면역화된 마우스의 림프절을 수거하고, NSO 골수종 세포와 융합시킨다.

[0179] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 과종하고, 바람직하게는 비융합된, 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 성장시킨다. 예를 들면, 모 골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)를 결여하는 경우, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노테린 및 티미딘(HAT 배지)을 포함하고, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0180] 특정 실시형태는, 효율적으로 융합하고 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 고도 생산을 뒷받침하고 HAT 배지 등의 배지에 감수성인 골수종 세포를 이용한다. 이들 중에서, 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예를 들면, NSO 세포주 또는 살크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA)로부터 이용 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 및 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)으로부터 입수 가능한 SP-2 또는 X63-Ag8.653 세포로부터 유래된 것들이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 혜데로골수종 세포주도 또한 인간 모노클로날 항체의 생산을 위해 기재되어 있다[참조: Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].

[0181] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는 ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정된다. 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 당해 기술분야에 공지된 방법, 예를 들면, 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예를 들면, 방사선면역검정(RIA) 또는 효소 결합된 면역흡착 검정(ELISA)에 의해 측정된다.

[0182] 목적하는 특이성, 친화성 또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 동정한 후, 클론은 제한 희석 절차에 의해 서브클로닝시키고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다[참조: Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, *supra*]. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들면, D-MEM 또는 RPMI 1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

[0183] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상의 면역글로불린 정제 절차, 예를 들면, 단백질 A-세파로즈, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

[0184] 본원에 기재된 항체는, 특이적 ApoC3(예: 인간 ApoC3)을 인식하고 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 임의의 기술에 의해 생성될 수 있는 항체 단편을 포함한다. 예를 들면, 본원에 기재된 Fab 및 $F(ab')_2$ 단편은 효소, 예를 들면, 파파인(Fab 단편을 생산하기 위해) 또는 펩신($F(ab')_2$ 단편을 생산하기 위해)을 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질분해 절단에 의해 생산할 수 있다. Fab 단편은 항체 분자의 2개 동일한 암 중의 하나에 상응하고, 중쇄의 VH 및 CH1 도메인과 쌍을 이루는 완전한 경쇄를 함유한다. $F(ab')_2$ 단편은 한지 영역의 디설파이드 결합에 의해 연결된 항체 분자의 2개 항원-결합 암을 함유한다.

[0185] 추가로, 본원에 기재된 항체는 또한 당해 기술분야에 공지된 다양한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능적 항체 도메인은 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 담지하는 파지 입자의 표면에 제시된다. 특히, VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA 서열은 동물 cDNA 라이브러리(예: 발병된 조직의 인간 또는 뮤린 cDNA 라이브러리)로부터 증폭시킨다. VH 및 VL 도메인을 코딩하는 DNA는 PCR에 의해 scFv 링커와 함께 재조합하고 파지미드 벡터에 클로닝시킨다. 벡터는 이. 콜라이에서 전기천공하고, 이. 콜라이에는 헬퍼 파지로 감염시킨다. 이들 방법에 사용된 파지는 전형적으로 fd 및 M13을 포함하는 필라멘트 파지

이고, VH 및 VL 도메인은 통상 파지 유전자 III 또는 유전자 VIII 중의 어느 하나와 재조합에 의해 융합시킨다. 특정 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 발현하는 파지를 선택하거나, 예를 들면, 표지된 항원 또는 고체 표면 또는 비드에 결합되거나 포획된 항원을 사용하여 항원으로 동정할 수 있다. 본원에 기재된 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예는 문헌[참조: Brinkman U *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; PCT Application No. PCT/GB91/001134; International Publication Nos. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 및 WO 97/13844; 및 U.S. Patent Nos. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 및 5,969,108]에 개시된 것들을 포함한다.

[0186]

상기 참조문헌에 기재된 바와 같이, 파지 선택 후, 파지로부터의 항체 코딩 영역을 단리하고, 이를 사용하여 인간 항체를 포함하는 완전한 항체 또는 임의의 기타 목적하는 항원 결합 단편을 생성하고, 예를 들면, 하기 기재된 바와 같이, 포유동물 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균을 포함하는 임의의 목적하는 숙주에서 발현시킬 수 있다. Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편 등의 항체 단편을 제조함에 의해 생산하는 기술은 또한 당해 기술분야에 공지된 방법, 예를 들면, 문헌[참조: PCT publication No. WO 92/22324; Mullinax RL *et al.*, (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; 및 Better M *et al.*, (1988) *Science* 240: 1041-1043]에 기재된 것들을 사용하여 이용할 수 있다.

[0187]

특정 실시형태에서, 완전한 항체를 생성하기 위해, 제한 부위를 보호하도록 VH 또는 VL 뉴클레오티드 서열, 제한 부위 및 플랭킹 서열을 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 주형, 예를 들면, scFv 클론으로부터 VH 또는 VL 서열을 증폭시킬 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 클로닝 기술을 사용하여, PCR 증폭된 VH 도메인은 VH 불변 영역을 발현하는 벡터에 클로닝시키고, PCR 증폭된 VL 도메인은 VL 불변 영역, 예를 들면, 인간 카파 또는 람다 불변 영역을 발현하는 벡터에 클로닝시킬 수 있다. 또한, VH 및 VL 도메인은 필요한 불변 영역을 발현하는 하나의 벡터에 클로닝시킬 수 있다. 이어서, 중쇄 전환 벡터 및 경쇄 전환 벡터를 세포주에 동시-형질감염시켜, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 기술을 사용하여, 전장 항체, 예를 들면, IgG를 발현하는 안정한 또는 일시적 세포주를 생성한다.

[0188]

키메라 항체는 항체의 상이한 부분이 상이한 면역글로불린 분자로부터 유래되는 분자이다. 예를 들면, 키메라 항체는 인간 항체의 불변 영역과 융합된 마우스 또는 랭트 모노클로날 항체의 가변 영역을 함유할 수 있다. 키메라 항체를 생산하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; 및 U.S. Patent Nos. 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397 및 6,331,415].

[0189]

인간화된 항체는 소정 항원에 결합할 수 있고, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 프레임워크 영역, 및 비-인간 면역글로불린(예: 뮤린 면역글로불린)의 아미노산 서열을 실질적으로 갖는 CDR을 포함한다. 특정 실시형태에서, 인간화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로불린의 것을 포함한다. 항체는 또한 중쇄의 CH1, 힌지, CH2, CH3 및 CH4 영역을 포함할 수 있다. 인간화된 항체는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는 임의 부류의 면역글로불린, 및 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 및 IgG₄를 포함하는 임의의 이소형으로부터 선택할 수 있다. 인간화된 항체는 당해 기술분야에 공지된 다양한 기술을 사용하여 생산할 수 있고, CDR-그래프팅(European Patent No. EP 239400; International Publication No. WO 91/09967; 및 U.S. Patent Nos. 5,225,539, 5,530,101 및 5,585,089), 베니어링 또는 재표면화(European Patent Nos. EP 592106 및 EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.*, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; 및 Roguska MA *et al.*, (1994) *PNAS* 91: 969-973), 쇄 셔플링(U.S. Patent No. 5,565,332) 및, 예를 들면, 문헌[참조: U.S. Pat. No. 6,407,213, U.S. Pat. No. 5,766,886, International Publication No. WO 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M *et al.*, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895-904; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 및 Pedersen JT *et al.*, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73]에 개시된 기술을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 또한, 미국 특허공개공보 제2005/0042664 A1호 (Feb. 24, 2005)(이는 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입됨)를 참조한다.

- [0190] 다중특이적 항체(예: 이중특이적 항체)를 제조하는 방법은, 예를 들면, 문헌[참조: U.S. Patent Nos. 7,951,917; 7,183,076; 8,227,577; 5,837,242; 5,989,830; 5,869,620; 6,132,992 및 8,586,713]에 기재되어 있다.
- [0191] 단일 도메인 항체, 예를 들면, 경쇄를 결여하는 항체는 당해 기술분야에 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다[참조: Riechmann L & Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25-38; Nuttall SD *et al.*, (2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74(4): 277-302; U.S. Patent No. 6,005,079; 및 International Publication Nos. WO 94/04678, WO 94/25591 및 WO 01/44301].
- [0192] 추가로, ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 또한 사용하여, 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 기술을 사용하여 항원을 "모방"하는 항-유전형을 생성할 수 있다[참조: Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; 및 Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438].
- [0193] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 항-ApoC3 항체와 동일한 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 에피토프에 결합하는, 본원에 기재된 항체는 인간 항체이다. 특정 실시형태에서, ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 대한 결합으로부터 본원에 기재된 항체의 어느 하나를 경쟁적으로 차단하는(예를 들면, 용량-의존적 방식으로), 본원에 기재된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들면, 기능적 내인성 면역글로불린을 발현할 수는 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용할 수 있다. 특히, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 복합체를 랜덤으로 또는 상동성 재조합에 의해 마우스 배성 줄기 세포에 도입할 수 있다. 또는, 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역을 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 추가하여 마우스 배성 줄기 세포에 도입할 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 별도로, 또는 상동성 재조합에 의해 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 동시에 비-기능적으로 될 수 있다. 특히, J_H 영역의 호모접합성 결실은 내인성 항체 생산을 방지한다. 변형된 배성 줄기 세포를 확장시키고, 배반포로 미량주입하여 키메라 마우스를 생산한다. 이어서, 키메라 마우스를 교배하여, 인간 항체를 발현하는 호모접합성 자손을 생산한다. 트랜스제닉 마우스를 선택된 항원, 예를 들면 항원(예: ApoC3(예: 인간 ApoC3))의 전부 또는 일부를 사용하여 통상의 방식으로 면역화시킨다. 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체는 통상의 하이브리도마 기술을 사용하여 면역화된 트랜스제닉 마우스로부터 수득할 수 있다. 트랜스제닉 마우스에 의해 함유된 인간 면역글로불린 도입유전자는 B 세포 분화 동안 재배열하고, 후속적으로 부류 스위칭 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 이러한 기술을 사용하여, 치료학적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 생산할 수 있다. 인간 항체를 생산하는 이러한 기술의 개요에 대해서는 문헌[참조: Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93]을 참조한다. 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체를 생산하는 이러한 기술 및 이러한 항체를 생산하는 프로토콜의 상세한 고찰에 대해서는 문헌[참조: International Publication Nos. WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 U.S. Patent Nos. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 및 5,939,598]을 참조한다. 인간 항체를 생산할 수 있는 마우스의 예는 XenomouseTM(Abgenix, Inc.; U.S. Patent Nos. 6,075,181 및 6,150,184), HuAb-MouseTM(Mederex, Inc./Gen Pharm; U.S. Patent Nos. 5,545,806 및 5,569, 825), 트랜스 크로모(Trans Chromo) MouseTM(Kirin) 및 KM MouseTM(Medarex/Kirin)를 포함한다.
- [0194] ApoC3(예: 인간 ApoC3)에 특이적으로 결합하는 인간 항체는, 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하여 상기 기재된 파지 디스플레이 방법을 포함하는 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법에 의해 제조할 수 있다[참조: U.S. Patent Nos. 4,444,887, 4,716,111 및 5,885,793; 및 International Publication Nos. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 및 WO 91/10741].
- [0195] 일부 실시형태에서, 인간 항체는 마우스-인간 하이브리도마를 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들면, 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스(EBV)로 형질전환시킨 인간 말초혈 램프구를 마우스 골수종 세포와 융합하여 인간 모노클로날 항체를 분비하는 마우스-인간 하이브리도마를 생산할 수 있고, 이들 마우스-인간 하이브리도마를 스크리닝하여 표적 항원(예: ApoC3(예: 인간 ApoC3))에 특이적으로 결합하는 인간 모노클로날 항체를 분비하는 것을 측정할 수 있다. 이러한 방법은 공지되어 있고, 당해 기술분야에 기재되어 있다[참조: Shinmoto H *et al.*, (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) Human Antibodies 14: 27-31].
- [0196] 6. 키트(kit)
- [0197] 또한, 본원에 기재된 하나 이상의 항체 또는 이의 약제학적 조성물 또는 접합체를 포함하는 키트가 제공된다.

특정 실시형태에서, 본원에는, 본원에 기재된 약제학적 조성물의 하나 이상의 성분, 예를 들면, 본원에 제공된 하나 이상의 항체가 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트가 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 본원에 기재된 약제학적 조성물 및 임의의 예방제 또는 치료제, 예를 들면, 본원에 기재된 것들을 함유한다. 이러한 용기(들)에 부수적으로 관련되는 것은 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형식의 통지일 수 있고, 이러한 통지는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매 당국에 의한 승인을 반영한다.

[0198] 또한, 상기 방법에 사용될 수 있는 키트가 제공된다. 한 가지 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 용기에 본원에 기재된 항체, 바람직하게는 정제된 항체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 키트는 대조군으로서 실질적으로 단리된 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원을 함유한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 키트는 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원과 반응하지 않는 대조군 항체를 추가로 포함한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 키트는 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원에 대한 항체의 결합을 검출하기 위한 하나 이상의 요소를 함유한다(예를 들면, 항체는 검출가능한 기질, 예를 들면, 형광 화합물, 효소적 기질, 방사성 화합물 또는 발광 화합물과 접합할 수 있거나, 제1 항체를 인식하는 제2 항체는 검출가능한 기질과 접합할 수 있다.). 특정 실시형태에서, 본원에 제공된 키트는 재조합에 의해 생성되거나 화학적으로 합성된 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원을 포함할 수 있다. 키트에 제공된 ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원은 또한 고체 지지체에 부착될 수 있다. 보다 특정 실시형태에서, 상기 기재된 키트의 검출 수단은 ApoC3(예: 인간 ApoC3)이 부착되는 고체 지지체를 포함한다. 이러한 키트는 또한 비-부착된 리포터-표지된 항-인간 항체 또는 항-마우스/랫트 항체를 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, ApoC3(예: 인간 ApoC3) 항원에 대한 항체의 결합은 상기 리포터-표지된 항체의 결합에 의해 검출할 수 있다.

0199] 실시예

[0200] 본 섹션의 실시예는 본 출원의 잇점 및 특징을 추가로 해명하기 위해 제공되며, 본원의 범위를 제한하는 것은 아니다. 실시예는 설명만을 목적으로 한다.

[0201] 실시예 1: 면역화된 동물로부터 항-ApoC3 항체 파지 디스플레이 라이브러리의 제작

[0202] 본 실시예는 항-ApoC3 항체 라이브러리의 초기 제작을 기재한다. 인간 혈청으로부터 정제된 인간 ApoC3(huApoC3) 단백질을 아텐 리씨치 앤드 테크놀로지(Athens Research and Technology)로부터 수득했다. 이러한 huApoC3 단백질을 하기 특정 실시예 뿐만 아니라 본 실시예에 사용했다. HuApoC3을 디미리스토일포스파티딜 콜린(DMPC) 리포좀과 복합체화하여 생리학적 관련 형태를 밀접하게 모방했다. 2마리 라마는, 문헌[참조: Klarenbeek and colleagues (Klarenbeek et al., Protein Eng Des Sel (2016) 29(4):123-133), 이는 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입됨]에 의해 기재된 절차에 따라 근육내 주사에 의해 프로인트 불완전 보조제와 함께 6개 용량의 huApoC3으로 면역화시켰다. 면역화 스케줄은 각각 최초 2개 용량의 100 μ g huApoC3 및 각각 4개 이상 용량의 50 μ g huApoC3, 이어서 각각 2개 부스터 용량의 50 μ g huApoC3을 사용한 매주 주사를 포함했다. 말초혈 림프구를 부스팅후 면역화된 라마의 혈액 샘플로부터 단리했다. 전체 RNA를 추출하고, 랜덤 프라이머로 증폭시킨 cDNA 라이브러리의 제조를 위한 주형으로 사용했다. 항체 레퍼토리를 증폭시키고, scFv 파지 디스플레이 라이브러리로서의 클론은 이전에 기재되어 있다[참조: Van der Woning et al., DNA immunization combined with scFv phage display identifies antagonistic GCGR specific antibodies and reveals new epitopes on the small extracellular loops. (2016) mAbs, 8(6):1126-35, 이는 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입됨].

[0203] 파지 디스플레이 라이브러리는 바이오패닝 절차에서 코팅된 huApoC3 상에 또는 달리는 코팅된 스트렙트아비딘 상에 포획된 비오티닐화 ApoC3으로 선택했다. 파지를 pH 5.5에서 용출시켜, 산성 조건하에 huApoC3에 대해 친화성을 상실한 항체 클론을 선택했다. 3라운드의 선택 후, 단일 콜로니를 제조하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 항체 스크리닝에 제공했다.

[0204] 실시예 2: 항-ApoC3 모노클로날 항체의 스크리닝

[0205] 본 실시예는 ApoC3에 결합하는 항체에 대해 실시예 1에서 제조된 scFv 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝을 기재한다. 2개의 ELISA-기반 스크리닝 방법을 채용하고, 하나는 플레이트 상에 직접 코팅된 정제된 ApoC3을 사용하고, 다른 하나는 플레이트 상에 코팅된 스트렙트아비딘에 의해 포획된 비오티닐화 ApoC3을 사용했다. 각 방법은, ApoC3에 대해 친화성을 갖는 다수의 항체 클론을 나타냈다. 이들 2개 검정으로부터 동정된 클론 사이에 유의한 중첩이 있지만, 그 차이는 2개 조건하에서 ApoC3 단백질의 입체배좌 및 에피토프의 노출에서 상위점

을 반영할 수 있다.

[0206] 2.1 직접 코팅된 ApoC3에 대한 친화성의 분석

실시예 1에서 작제된 scFv 과자 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 항체 클론은 플레이트 상에 직접 코팅된 정제된 huApoC3(Athens Research and Technology)으로 ELISA 검정에 의해 분석했다. 인산염 완충제 염수 (PBS)(pH 7.4)에서 희석시킨 1 내지 10 μ g/ml(100 μ l/웰)의 농도에서 인간 천연 ApoC3을 밤새 4°C에서 미세역가 면역검정 Maxisorp 96-웰 플레이트(NUNC cat#456537 등)에서 배양했다. 코팅된 플레이트는 트윈-20을 0.05%(v/v)(PBS-T)로 함유하는 250 μ l/웰 PBS로 3회 세척하여 과량의 비결합된 항원을 제거했다. 세척 후, PBS에서 제조된 250 μ l 4%(m/v) 건조된 탈지 분유를 차단을 위해 각각의 코팅된 웰에 첨가하고, 플레이트를 플레이트 진탕기(TitraMax 1000 또는 Heidolph) 상에서 실온에서 1 내지 2시간 동안 배양했다. 차단 후, 플레이트를 3회 세척하여 250 μ l/웰 PBS-T로 과량의 차단 용액을 제거했다. 조 세포질 추출물(P.E.)로부터의 항체 단편(scFv)(100 μ l의 최종 용적까지 PBS에서 1:5로 희석)을 1시간 동안 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 고정된 항원에 결합시켰다. P.E.에서 결합되지 않은 가용성 scFv는 플레이트를 250 μ l/웰 PBS-T로 5회 세척하여 제거했다. 검출을 위해, scFv 항체 단편의 C-말단에 융합된 c-myc 태그를 인식하는 100 μ l/웰의 항 c-myc 서양고추냉이 페옥시다제(HRP)-접합된 모노클로날 Ab(Bethyl; cat#: A190-105P 등)를 1%(m/v) 건조된 탈지 분유 용액에서 1:5000 희석으로 사용했다. 실온에서 1시간 배양한 후, 플레이트를 250 μ l/웰 PBS-T로 3회 및 250 μ l/웰 PBS로 3회 연속 세척했다. 분광광도 검출을 사용하여, HRP 효소 접합체에 의해 촉매된 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB, eBioscience, cat#:00-4201-56)의 산화를 모니터링했다. 반응은 100 μ l/웰의 0.5M H₂SO₄을 첨가하여 정지시켰다. 최종 생성물의 흡광도는 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 450nm에서 측정했다. 결합 특이성은 블랭크 P.E.를 제공받은 대조군 웰과 비교하여 흡광도 값에 기초하여 측정했다.

[0208] 30개 항체는 huApoC3에 대해 친화성을 갖는 것으로 동정되었다. 가장 강력한 신호를 제공하는 클론은 8B4, 8A4, 8H4, 1D5, 12E12, 6A6, 10B6, 4H1, 5A7, 8F4, 5C11, 7D9, 5A8, 9A4, 4C2, 5A4, 12C3 및 5E5이다. 이들 클론중 일부의 VH 및 VL의 서열은 표 1 내지 4에 수록되어 있다.

[0209] 2.2 포획된 비오티닐화 ApoC3에 대한 친화성의 분석

실시예 1에서 작제된 scFv 과자 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 항체 클론은 플레이트 상에 코팅된 스트렙트아비딘에 의해 포획된 비오티닐화 ApoC3으로 ELISA 검정에 의해 분석했다. 2-5 μ g/ml(100 μ l/웰)의 농도로 PBS(pH 7.4)에서 희석시킨 뉴트라비딘(Fisher Scientific LDAct#: W9995L)을 4°C에서 밤새 미세역가 면역검정 Maxisorp 96-웰 플레이트(NUNC cat#456537 등)에서 배양했다. 코팅된 플레이트를 250 μ l/웰 PBS-T로 3회 세척하여 과량의 비결합된 뉴트라비딘을 제거했다. 세척 후, PBS에서 제조된 250 μ l 1%(m/v)의 카제인 용액을 차단을 위해 각각의 코팅된 웰에 첨가하고, 플레이트를 1 내지 2시간 동안 실온에서 플레이트 진탕기(TitraMax 1000, Heidolph 등)로 배양했다. 차단 후, 플레이트를 3회 세척하여 과량의 차단 용액을 250 μ l/웰 PBS-T로 제거했다. 비오틴 그룹을 인간 천연 ApoC3 단백질(Athens Research and Technology)의 랜덤 부위에 도입했다. PBS 중의 0.1%(m/v) 카제인에서 1 내지 5nM(100 μ l/웰)의 농도로 희석시킨 비오티닐화 ApoC3을 코팅된 및 차단된 플레이트에서 1시간 동안 실온에서 배양하여 ApoC3 항원을 포획했다. 비결합된 항원은 플레이트를 250 μ l/웰 PBS-T로 5회 세척하여 제거했다. 조 P.E.(최종 용적 100 μ l까지 PBS에서 1:5로 희석)로부터의 항체 단편(scFv)을 실온에서 1시간 배양 동안 포획된 항원에 결합하도록 했다. 비결합된 가용성 scFv 단편은 플레이트를 250 μ l/웰 PBS-T로 5회 세척하여 제거했다. 검출을 위해, scFv 항체 단편의 C-말단에 융합된 c-myc 태그를 인식하는 100 μ l/웰의 항 c-myc 서양고추냉이 페옥시다제(HRP)-접합된 모노클로날 항체(Bethyl; cat#: A190-105P 등)를 1%(m/v) 건조된 탈지 분유 용액에서 1:5000 희석으로 사용했다. 실온에서 1시간 배양한 후, 플레이트를 250 μ l/웰 PBS-T로 3회 및 250 μ l/웰 PBS로 3회 연속 세척했다. 분광광도 검출을 사용하여 HRP 효소 접합체에 의해 촉매된 TMB의 산화를 모니터링했다. 반응은 100 μ l/웰의 0.5M H₂SO₄를 첨가하여 중단시켰다. 최종 생성물의 흡광도는 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 450nm에서 측정했다. 결합 특이성은 블랭크 P.E.를 제공받은 대조군 웰과 비교하여 흡광도 값에 기초하여 측정했다.

[0211] 17개 항체는 huApoC3에 대해 친화성을 갖는 것으로 동정되었다. 450nm에서 가장 강력한 흡광도를 제공하는 클론은 12E12, 12C3, 13C10, 13G7, 12G8, 14C4, 13F2, 13C7, 14G4, 12D7, 14C7, 12A3 및 12E3이다. 클론중 일부의 VH 및 VL의 서열은 표 1 내지 4에 수록되어 있다.

[0212] 2.3 비아코어 SPR 검정

본 실시예는 비아코어(Biacore) 3000 장치(Biacore AB)를 사용하는 SPR-기초 검정을 사용하여 중성 조건하에

ApoC3에 대한 이들의 친화성에 관한 항-ApoC3 항체의 특성화를 기재한다. 천연 huApoC3 단백질을 CM5 칩 상에 고정시켰다. 고정화는 NHS/EDC 키트(Biacore AB)를 사용하여 비아코어에 의해 제공된 방법에 따라 수행했고; 칩의 활성화 후, 4.5의 pH를 갖는 10mM 아세테이트 완충액 중의 60 μ g/ml의 인간 ApoC3의 용액을 제조하고, 표면 밀도가 대략 1000RU에 도달할 때까지 주사했다. 스트렙트아비딘 코팅된 칩(SA) 상에 인간 ApoC3의 포획은 20 μ l의 10 μ g/ml 비오티닐화 인간 ApoC3의 주사를 통해 대략 500RU의 표면 밀도에 도달하게 함으로써 비아코어에 의해 제공된 방법에 따라 pH 7.4에서 수행했다. HBS-EP 완충제(GE, cat # BR-1008-26; 0.010M HEPES, 0.150M NaCl, 3mM EDTA, 0.05%(v/v) 계면활성제 P20, pH 7.4)에서 희석시킨 1-100nM 범위의 시험 항체 60 μ l를 주사하고, 30 μ l/분의 유속으로 유동 세포를 통과시킨 다음, pH 7.4 또는 pH 5.5에서 5분 동안 오프-속도 세척을 수행했다. 해리 후, 유동 세포 표면은 pH 1.5에서 10 μ l의 10mM NaOH/1M NaCl 및 10 μ l의 10mM 글리신을 주사하여 재생시켰다. 수득되는 센서그램은 결합 속도를 유도하기 위해 랑무어(Langmuir) 1:1 결합 모델을 사용하는 BIAevaluation 4.1 소프트웨어를 사용하여 분석했다. 데이터는 제로 조정하고, 참조 세포 센서그램을 차감했다.

[0214] 다수의 scFv-Fc 항체를 이러한 검정으로 검사했다. 이들 항체의 회합 속도(k_a), 해리 속도(k_d), 분석물 결합 용량(R_{max}), 평형 회합 상수(K_A) 및 평형 해리 상수(K_D)는 표 5에 제시되어 있다.

[0215] [표 5]

비아코어 친화성 측정 결과

클론 ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	R_{max} (RU)	K_A (1/M)	K_D (M)
1D5	1,15E+06	3,34E-04	2130	3,43E+09	2,91E-10
1G4	5,82E+05	0,0115	694	5,07E+07	1,97E-08
4C2	2,06E+05	2,55E-04	2450	8,07E+08	1,24E-09
4H1	3,91E+05	1,03E-04	2320	3,80E+09	2,63E-10
5A4	1,06E+06	3,51E-04	1260	3,02E+09	3,31E-10
5A7	1,35E+06	6,47E-04	460	2,08E+09	4,80E-10
5A11	1,44E+06	6,68E-04	412	2,15E+09	4,65E-10
5C11	7,39E+04	7,82E-04	429	9,44E+07	1,06E-08
5E5	2,60E+05	4,37E-04	764	5,94E+08	1,68E-09
5E7	5,16E+05	9,16E-04	204	5,63E+08	1,78E-09
6A6	1,19E+06	1,86E-04	1140	6,41E+09	1,56E-10
7A9	2,59E+06	6,70E-04	516	3,87E+09	2,58E-10
7D9	5,99E+04	9,64E-04	230	6,21E+07	1,61E-08
8A4	3,00E+05	7,02E-05	581	4,27E+09	2,34E-10
8B7	2,81E+06	6,75E-04	516	4,16E+09	2,40E-10
8F4	1,63E+05	9,44E-05	811	1,72E+09	5,81E-10
8H4	1,87E+05	7,44E-05	1030	2,52E+09	3,97E-10
10B6	1,71E+05	6,64E-05	620	2,58E+09	3,88E-10
11H1	1,22E+05	2,07E-04	935	5,89E+08	1,70E-09
14C7*	8.20E+04	5.61E-05	358	1.46E+09	6.84E-10

[0217]

[0218] * 이 클론은 IgG1 포맷으로 검사했다.

[0219] 실시예 3: 지질 경쟁 검정

[0220] 본 실시예는, 이들이 ApoC3에 대한 결합을 위해 지질과 경쟁하는지에 관한 항-ApoC3 항체의 특성화를 기재한다. 먼저, ELISA-기초 검정을 수행하여, 지질 결합을 무효로 하거나 무효로 하지 않는 항체를 동정했다. 결과를 추가로 검증하기 위해, 이어서 표면 플라즈몬 공명(SPR)-기초 검정을 특정 클론으로 수행했다.

[0221] 3.1 ELISA-기초 검정

[0222] ELISA-기초 지질 경쟁 검정을 수행하여, 실시예 2로부터 동정된 항-ApoC3 항체가 ELISA 플레이트 상에 고정된 지질과 huApoC3 단백질 사이의 상호작용을 방해했는지를 측정했다. 요약하면, 클로로포름 중의 1,2-디미리스토

일-sn-글리세로-3-포스포콜린(Avanti Polar Lipids DMPC; 14:0 PC)의 스톡 용액을 메탄올:클로로포름:물의 혼합물(2.0:1.0:0.8)에서 회석시켰다. 5 μ g의 DMPC를 그레이너(Greiner) U-하부 고도 결합 플레이트(# 850345)의 각 웰에 분주하고, 클로로포름, 메탄올 및 물 용매를 실온에서 최소 3시간 동안 증발시켰다. 웰은 PBS에 용해시킨 지방-비함유 분유 분말(본원에서 "청명한 분유 PBS"로 지칭됨)로 이루어진 200 μ l에서 밤새 4°C에서 차단시켰다. 각 시험 항체를 인간 혈청(Athens Research and Technology)으로부터 정제된 천연 ApoC3 단백질과 혼합했다. 50 μ l의 혼합된 용액을 DMPC-코팅된 미세역가 플레이트에 분주하고, 플레이트를 실온에서 2시간 동안 300rpm으로 회전시켰다. 플레이트를 200 μ l PBS로 4회 세척했다. 청명한 분유 PBS에 용해시킨 50 μ l의 비오티닐화 항-ApoC3 폴리클로날 염소 항체(Abcam # ab21024)를 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 동안 300rpm으로 회전시켰다. 플레이트를 200 μ l PBS로 1회 세척하고, 50 μ l 스트렙트아비딘-HRP 용액(Abcam # 34028; PBS에서 100배로 회석됨)을 첨가했다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 300rpm으로 회전시켰다. 웰을 200 μ l PBS로 4회 세척했다. 80 μ l TMB ELISA 발색 시약(Thermo Ultra-TMB ELISA #34028)을 첨가하고, 발색후 발색 반응을 50 μ l 0.5N HC1에 의해 정지시켰다. 450nm에서의 흡광도를 관독하고, 데이터는 4-파라미터 논리 함수(GraphPad Prism 6)를 사용하여 분석했다.

[0223] 도 1에 제시된 바와 같이, 클론 12C12, 12D7, 12G8, 13G7, 14C4 및 14C7은 huApoC3에 대한 지질의 결합을 억제시킨 반면, 클론 12A3, 12C3, 12D1, 12D4, 12E12, 13C7, 13C10, 13F2, 14F2 및 14G4는 억제시키지 않았다.

3.2 SPR-기초 VLDL 결합 검정

[0225] SPR-기초 지질 경쟁 검정은, 선택된 항-ApoC3 항체, 즉 scFv-Fc 포맷의 14C7, 5E5 및 6A6이 ApoC3 결합을 위해 지질과 경쟁하는지를 확인하기 위해 수행했다. VLDL 리포좀은 문현[참조: Mendoza-Barbera and colleagues (Mendoza-Barbera et al., J Lipid Res 2013)]에 기재된 바와 같이 L1 센서 칩(Biacore, Uppsala, Sweden) 상에 고정시켰다. 도 2, 파트 A에 제시된 바와 같이, t=1800s에서 10 μ l/분의 유속으로 10 μ g/ml ApoC3의 주사는 완충제 또는 14C7 Ab가 주사된 음성 대조군과 비교하여 증가된 결합 신호를 생성했고, 이는 ApoC3이 고정된 VLDL 리포좀 내로 도입되었음을 나타낸다. t=2100s에서 완충제의 주사는 신호의 감소를 유도했지만, 신호는 음성 대조군과 비교하여 기준선을 초과한 상태였고, 이는 ApoC3이 VLDL 리포좀 내로 도입되었음을 시사한다. 비교에서, 예비-배양된 10 μ g/ml ApoC3 및 10 μ g/ml 14C7 항체의 혼합물이 t=1800s("14C7 +"로서 표시됨)에서 주사되는 경우, 결합 신호의 초기 증가가 관찰되었지만, t=2100s에서 완충제 주사시, 반응은 음성 대조군과 동일하게 배경 수준으로 복귀했고, 이는 14C7이 ApoC3과 지질 사이의 안정한 상호작용을 방해했음을 시사한다.

[0226] ELISA 검정에서 ApoC3에 대한 결합을 위해 지질과 경쟁하지 않는 5E5 및 6A6은 또한 이러한 SPR-기초 검정 시스템에서 검사했다. 도 2, 파트 B에 제시된 바와 같이, 5E5 또는 6A6의 존재하에 ApoC3 주사는 결합 신호의 증가를 유도했고, 결합 신호는 ApoC3 단독의 신호보다 t=2100s에서 완충제 주사시 더욱 강력한 상태였다. 이 결과는 ApoC3-5E5 또는 ApoC3-6A6 복합체가 ApoC3-VLDL과의 상호작용을 통해 센서 칩 상에 유지되었음을 시사한다. 따라서, 5E5 및 6A6은 ApoC3 결합을 위해 지질과 경쟁하지 않았다. ApoC3 부재하에 5E5 또는 6A6 단독의 대조군 샘플은 시험 표면에 결합하지 않았다.

3.3 SPR-기초 리포좀 결합 검정

[0228] 제2 SPR-기초 지질 경쟁 검정은 IgG1 포맷의 14C7, 5E5 및 6A6 항체가 ApoC3 결합을 위해 지질과 경쟁했는지를 확인하기 위해 수행했다. 요약하면, DMPC 리포좀은 유리 바이알에서 대략 5mg DMPC(Sigma)를 클로로포름에 용해시켜 100mg/ml의 농도에 도달하게 함으로써 제조했다. 유리 바이알을 진공하에 3시간 동안 위치시켜 클로로포름을 제거하고, 이에 의해 DMPC가 지질 필름을 형성하도록 했다. 1ml의 재현탁 완충제(20mM Tris-HCl, 140mM NaCl, pH 7.4)를 지질 필름에 첨가하고, 필름이 벽으로부터 제거될 때까지 격렬하게 와동시켰다. 6회의 동결해동 사이클(액체 질소 중에서) 후, 혼탁액을 30회 스트로크 동안 100nm 폴리카보네이트 막을 통해 압출시켜 리포좀을 형성했다. 리포좀은 HBS-N 완충제에서 1:10으로 회석시켰다. L1 센서 칩은 10 μ l/분으로 10 μ l의 100mM NaOH를 주사한 다음, 150 μ l/분으로 300 μ l의 HBS-N 완충제를 주사함으로써 활성화시켰다. 20 μ l의 리포좀을 활성화된 칩 표면 상에 고정되도록 2 μ l/분으로 주사했다. 후속적으로, 20 μ l의 100mM NaOH를 주사한 다음, 10 μ l의 100 μ g/ml BSA를 주사했다. 표면을 HBS-N 완충제로 세척한 후, 천연 인간 ApoC3 단백질을 t=1800s에서 주사하여 리포좀-ApoC3 복합체를 형성했다. 이어서, 14C7, 5E5 및 6A6 항체를 t=4400s에서 주사했다.

[0229] 도 2, 파트 C에 제시된 바와 같이, 보다 큰 복합체는 5E5 및 6A6 항체의 주사시에 검출되었고, 이는 이들 2개 항체가 지질-결합된 ApoC3에 결합할 수 있음을 시사한다. 5E5 및 6A6 항체는 ApoA1이 ApoC3을 치환한 대조군 그룹에서 신호를 생성하지 않았고(데이터는 제시되지 않음), 이는 이들이 ApoA1 또는 DMPC 리포좀 단독에 결합하지 않았음을 나타낸다.

[0230] 실시예 4: ApoC3-매개된 지질단백질 리파제(LPL) 억제 검정

[0231] 4.1 LPL 활성의 조절 분석

[0232] 본 실시예는 ApoC3-매개된 LPL 억제를 감쇠시키는 이들의 능력에 관한 항-ApoC3 항체의 특성화를 기재한다. 14C7, 13G7, 5E5 및 6A6 항체를 IgG1 형태로 재포맷하고, 시험관내 LPL 활성 검정으로 검사했다. 14C7 및 13G7은 LPL의 ApoC3-매개된 억제를 감쇠시키고, LPL 활성을 용량-의존적 방식으로 유의적으로 증가시켰다(도 3). 14C7 및 13G7의 EC50 값은 각각 약 2 μ M 및 3 μ M이었다. 이러한 감쇠는, 5 μ M 초과의 EC50 값을 갖는 5E5 또는 6A6 항체에서 보다 약하고 덜 유의적이었다.

[0233] 4.2 재료 및 방법

[0234] 20% 인트라리피드 에멀젼(Santa Cruz Biotechnology; SC-215182)을 50mM TRIS-HCl pH 8.0 완충제로 10°C에서 15분 동안 15,000×g으로 부유에 의해 세척하여 과량의 인지질 및 기타 작은 지질 입자를 제거했다. 세척 프로세스의 종료시에, 인트라리피드는 10%인 것으로 평가되었다. 인트라리피드를 50mM TRIS-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 2% BSA, 15단위/mL 해파린으로 구성된 검정 완충제로 100배 희석했다. 검정은, 시험 항체를 함유하는 20 μ l의 인트라리피드, 검정 완충제 중의 인간 혈청(Athens Research and Technology)으로부터 정제된 20 μ l의 천연 ApoC3 단백질 및 소 우유로부터 단리된 검정 완충제 중의 20 μ l의 LPL의 첨가에 의해 V-하부 폴리프로필렌 플레이트(Falcon # 353263)에서 조립했다. 검정 완충제 중의 인트라리피드, ApoC3 단백질 및 LPL의 최종 농도는 각각 0.1%, 1.5 μ M 및 30nM이었다. 검정은 30분 동안 30°C에서 진행되도록 했고, 20 μ M 오를리스테이트(Orlistate)가 보충된 100 μ l Wako NEFA 시약 A(999-34691; 995-34791)의 첨가에 의해 종결시켰다. 30°C에서 20분 후, 200 μ M Amplex 레드(AAT Bioquest)가 보충된 50 μ L의 Wako NEFA 시약 B(991-34891; 993-35191)를 첨가하고, 플레이트를 20분 동안 30°C에서 배양했다. 120 μ l 분취량을 흑색 96-웰 플레이트(Costar # 3915)로 옮기고, 형광을 ex 560nm/em 585nm에서 판독했다. 데이터는 4-파라미터 논리적 함수(GraphPad Prism 6)를 사용하여 분석했다.

[0235] 실시예 5: 간세포 VLDL 흡수 검정

[0236] 5.1 간세포 VLDL 흡수의 분석

[0237] 본 실시예는 ApoC3에 의해 간세포 VLDL 흡수의 억제를 역전시키는 이들의 능력에 관한 항-ApoC3 항체의 특성화를 기재한다. 도 4에 제시된 바와 같이, 클론 5A4, 5A7, 5A11, 5E5, 6A6, 7A9, 8A4, 8B4, 8B7, 8F4, 8H4, 10B6, 12A3, 12C3, 12C12, 12D1, 12D4, 12E12, 13C7, 13G7, 14C4, 14C7 및 14G4는 HepG2 세포에 의한 VLDL 흡수를 증가시켰다. VLDL 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력의 감쇠는 도 4의 값으로부터 정량화할 수 있다. 제1 바 표지된 "ApoC3"은 간세포 배양물에 첨가된 정제된 ApoC3에 의한 VLDL 흡수의 수준을 나타낸다. 제2 바 표지된 "대조군"은 외인성 ApoC3의 부재하에 간세포 배양물에서 VLDL 흡수의 수준을 나타낸다. 0% 억제로서 제1 바의 값 및 100% 억제로서 제2 바의 값을 취하면, 5A4, 5A7, 5A11, 5E5, 6A6, 7A9, 8A4, 8B4, 8B7, 8F4, 8H4, 10B6, 12A3, 12C3, 12C12, 12D1, 12D4, 12E12, 13C7, 13G7, 14C4, 14C7 및 14G4에 의해 VLDL 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력의 감쇠는 각각 약 100%, 50%, 55%, 100%, 75%, 50%, 40%, 60%, 40%, 75%, 70%, 70%, 100%, 85%, 100%, 60%, 60%, 40%, 95%, 100%, 60%, 100% 및 100%이다(도 4, 파트 A). 5A7, 7A9 및 8B7는 동일한 VH 및 VL 서열을 갖는다. 클론 1D5, 1D8, 1G4, 4C2, 4H1, 5A8, 5E7, 7D9 및 13C10은 HepG2 세포에 의한 VLDL 흡수를 억제하는 ApoC3의 능력을 감쇠시키지 않았다(도 4, 파트 B).

[0238] 5.2 재료 및 방법

[0239] HepG2 세포(ATCC HB-8065)는 10% FCS(Seradigm)이 보충된 100 μ l 완전 MEM(Life Technologies) 중의 폴리-d-리신 코팅된, 96-웰 조직 배양 플레이트(Greiner Bio-One #655940) 상에 과종하고, 5% CO2와 함께 37°C에서 배양했다. 24시간 후, 배지를 제거하고, 세포 단층을 0.0125% 소 혈청 알부민(Roche)이 보충된 200 μ l 완전 MEM으로 1회 세척했다. 0.0125% 소 혈청 알부민이 보충된 완전 MEM의 100 μ l 신선한 배지를 첨가했다. 추가 24시간 후, 배지를 제거하고, 0.0125% BSA가 보충된 MEM에 3 μ M ApoC3(Athens Research and Technology) 및 1.5 내지 4 μ M 시험 항체(scFv-Fc 포맷으로)를 함유하는 50 μ l의 시험 혼합물로 교환했다. 37°C에서 15분 배양한 후, 30 μ g /mL ApoC3-고갈된 DiI VLDL(Kalen Biomedical, LLC # 770130-9)을 시험 혼합물에 첨가했다. 4시간 배양한 후, 시험 혼합물을 제거하고, 세포를 20분 동안 37°C에서 5% CO2로 완전 MEM에서 희석된 100 μ l 1% 인트라리피드와 함께 배양했다. 배지를 제거하고, 세포를 200 μ l 37°C DPBS(Life Technologies 14190-144)로 3회 세척했다. 세척 후, 100 μ l 이소프로판을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 온화하게 진탕시키면서 실온에서 15분 동안 배양했다. 75 μ l 분취량을 흑색 96-웰 플레이트(VWR 89089-582)로 옮기고, 형광을 측정했다(ex=520nm; em=580).

단위 용적 이소프로판을 당 세포로부터 추출된 DiI-VLDL의 양은 DiI-VLDL 표준 곡선으로부터 측정했다. 잔류 이소프로판을 당 세포 플레이트로부터 제거하고, 100 μ l의 용해 완충제(0.1N NaOH, 0.1% SDS)를 각 웰에 첨가했다. 최소 30분 배양 후, 25 μ l 분취량을 사용하여 단백질을 정량했다(Pierce BCA Protein Assay; Thermo Scientific #23225). 세포 내로 VLDL 흡수의 양은 DiI-VLDL 대 단백질의 비율로서 계산했다. 데이터는 GraphPad Prism 6을 사용하여 그래프화하고, 평균 +/- SEM으로 보고했다. 다중 비교를 사용한 일방향 ANOVA는 GraphPad Prism 6을 사용하여 계산했다.

[0240] 실시예 6: 이종간 반응성 검정

본 실시예는 비아코어-기초 검정을 사용하여 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)(사이노몰거스 원숭이) ApoC3(cynoApoC3) 단백질과 교차 반응하는 이들의 능력에 관한 항-ApoC3 항체의 특성화를 기재한다. 도 5에 제시된 바와 같이, IgG1 포맷의 14C7(파트 A), 5A7(파트 B), 5E5(파트 C) 및 6A6(파트 D)는 모두 cynoApoC3에 결합할 수 있었지만, cynoApoC3에 대한 이들의 친화성은 huApoC3에 대한 이들의 친화성보다 낮았다.

SPR 실험은 비아코어 3000 장치(GE Healthcare)를 사용하여 수행했다. CM5 센서 칩의 유동 세포는 아민 커플링 화학을 사용하여 14C7, 5A7, 5E5 및 6A6(~2000RU)의 생성된 IgG 포맷화 항체와 커플링시켰다. 커플링은, pH 5.0에서 10mM 나트륨 아세테이트 완충제 중의 10 μ g/ml 항체 용액을 사용하여, 코팅 밀도로서 2000RU를 목적으로 하는 적응 고정화 비아코어 프로토콜을 사용하여 수행했다. 모든 실험에 대해, pH 7.4의 HBS-EP 완충제를 작동 및 회식 완충제로서 사용했다. 10 내지 200 μ g/ml의 농도 범위에서 60 μ l의 인간 천연 ApoC3 또는 사이노몰거스 원숭이 천연 ApoC3 단백질 제제를 모든 유동 채널에 주입한 다음, 5분 동안 pH 7.4에서 오프-속도 세척했다. 모든 주사는 25°C에서 30 μ l/ml의 일정 유동 속도에서 수행했다. 해리 후, 유동 세포 표면은 pH 1.5에서 10 μ l의 10mM NaOH/1M NaCl 및 10 μ l의 10mM 클리신을 주사하여 재생시켰다. 블랭크 채널 차감후 수득된 센서그램을 사용하여 이종간 반응성을 확인하고 친화성을 평가했다.

[0243] 실시예 7: 항-ApoC3 항체 5E5, 6A6 및 14C7의 에피토프 맵핑

[0244] 7.1 5E5, 6A6 및 14C7의 에피토프 스캐닝

본 실시예는 5E5, 6A6 및 14C7 항체의 에피토프 스캐닝을 기재한다. 라마 항체 5E5를 1 μ g/ml의 농도에서 ApoC3 웨티드 마이크로어레이와 함께 배양하고, 마이크로어레이를 제2 및 대조군 항체로 염색시켰다. 7/7(적색/녹색)의 스캐닝 강도의 판독은 매우 양호한 신호-대-노이즈 비율을 나타냈고, 이는 컨센서스 모티브 FSEFWLDPE(서열번호 3)를 갖는 인접한 10개 aa 및 13개 aa 웨티드에 의해 형성된 2개 에피토프-유사 스팟 패턴을 갖는 강력하고 명료한 모노클로날 반응을 나타낸다(도 6, 파트 A).

라마 항체 6A6을 0.2 μ g/ml의 농도로 ApoC3 웨티드 마이크로어레이와 함께 배양하고, 마이크로어레이를 제2 및 대조군 항체로 염색시켰다. 7/7(적색/녹색)의 스캐닝 강도의 판독은 매우 양호한 신호-대-노이즈 비율을 나타냈고, 이는 컨센서스 모티브 FSEFWLDPE(서열번호 3)을 갖는 인접한 10개 aa 및 13개 aa 웨티드에 의해 형성된 2개 에피토프-유사 스팟 패턴을 갖는 강력하고 명료한 모노클로날 반응을 나타낸다(도 6, 파트 B).

라마 항체 14C7을 1 μ g/ml 및 10 μ g/ml의 농도로 ApoC3 웨티드 마이크로어레이와 함께 배양하고, 마이크로어레이를 제2 및 대조군 항체로 염색시켰다. 7/7(적색/녹색)의 스캐닝 강도의 판독은 양호한 신호-대-노이즈 비율을 나타냈고, 이는 컨센서스 모티브 GWVTDGFSSLK(서열번호 2)를 갖는 인접한 13개 aa 웨티드에 의해 형성된 단일 에피토프-유사 스팟 패턴을 갖는 명료한 모노클로날 반응을 나타낸다(도 5, 파트 C).

[0248] 7.2 5E5, 6A6 및 14C7의 에피토프 치환 스캐닝

컨센서스 모티브 FSEFWLDPE(서열번호 3)은, 에피토프와 5E5 또는 6A6 항체 사이의 상호작용에 중요한 아미노산 잔기를 동정하기 위해 치환 스캐닝에 의해 추가로 분석했다. 13개 aa 사이클릭 구속된 웨티드의 어레이를 합성했다. 어레이의 각 행에서, 웨티드 DKFSEFWLDPEV(서열번호 44) 중의 단일 아미노산 잔기가 치환되고, 여기서 치환 잔기는 어레이의 컬럼에 의해 제시되었다.

표 6(야생형 ApoC3 웨티드(서열번호 44)에 대한 결합의 퍼센트로서 표시된 친화성) 및 치환 매트릭스(도 7, 파트 A)에 제시된 바와 같이, 치환 어레이에 대한 5E5의 결합은 성숙 huApoC3(서열번호 1)의 W65 및 D66이 mAb 5E5의 결합에 필수적이고 임의의 기타 아미노산에 의한 교환도 허용하지 않는 것을 입증했다. 성숙 huApoC3의 S62 및 D68은 또한 고도로 보존되었고; A 또는 V에 의한 S62의 치환 및 E 또는 P에 의한 D68의 치환은 스팟 강도의 감소를 약 60% 이상 유발했다. 그러나, T에 의한 S62의 보존적 치환은 스팟 강도의 배증을 가져왔다. 아미노산 L67 및 P69는 적절하게 보존되었고; T 또는 V에 의한 L67의 치환 및 T 또는 S에 의한 P69의 치환은 충분

히 허용되었지만, 다른 아미노산에 의한 교환은 결합에서 대략 50% 상실을 가져왔다. 아미노산 위치 F61 및 E63은 보다 덜 보존되었지만, 야생형 및 소수의 추가 아미노산(위치 F61의 E 및 Y; 위치 E63의 Y, P 및 A)에 대한 명확한 우선성을 나타냈고; 다른 아미노산에 의한 교환은 스팟 강도의 약간의 감소만을 유발했다. 아미노산 F64는 완전히 가변성이었다. 가변 아미노산 위치 D59 및 E70은 또한 야생형 아미노산에 대한 우선성을 명확히 나타냈고, 산성 아미노산 D 및 E에 대한 일반적 및 보다 적은 특이적 우선성을 나타냈다.

[0251]

[0252] 치환된 ApoC3 펩티드에 대한 5E5의 친화성

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

[0253]

[0254] 제1 열은 야생형 ApoC3 펩티드 중의 아미노산 위치를 나타낸다. 제1 컬럼은 특정 아미노산 치환을 나타낸다.

표 7(야생형 ApoC3 펩티드(서열번호 44)에 대한 결합의 퍼센트로서 나타낸 친화성) 및 치환 매트릭스(도 7, 파트 B)에 제시된 바와 같이, 치환 어레이에 대한 6A6의 결합은 성숙 huApoC3(서열번호 1)의 E70이 mAb 6A6의 결합에 필수적이고 임의의 다른 아미노산에 의한 교환을 허용하지 않음을 입증했다. 성숙 huApoC3의 D66 및 D68은 또한 고도로 보존되었고; E에 의한 보존적 교환은 위치 D66에서 스팟 강도의 80% 감소 및 위치 D68에서 44%

감소를 유발했고, 다른 아미노산에 의한 치환은 항체 결합의 완전한 손실 없이 허용되지 않았다. L67은 충분히 보존되었고; I 또는 T에 의한 치환은 항체 결합에 영향을 미치지 않았지만, V 또는 M에 의한 교환은 스팟 강도에서 대략 50% 감소를 가져왔다. E63은 적절히 보존되었지만, D에 의한 보존적 교환에 감수성이고; P에 의한 치환도, 가능하게는 중첩 효과에 기인하여, 약 1.5배 더 높은 스팟 강도를 가져왔다. W65는 또한 적절히 보존되었지만, E, S, D 및 T에 의한 교환은 증가된 스팟 강도를 유도했고; 그러나 다른 아미노산에 의한 치환은 항체 결합에서 적어도 45% 감소를 유발했다. F61은 야생형 아미노산 또는 Y에 의한 보존적 치환에 대해 명료한 우선성을 나타냈지만, 일반적으로 덜 보존되었고 6A6에 대한 결합에서 완전한 손실 없이 모든 다른 아미노산에 의한 교환에 감수성이었다. S62 및 P69는 야생형 아미노산에 대해 어느 정도의 우선성을 나타냈지만, 양 위치는 불충분하게 보존되었고, 항체 결합에 어떠한 효과 없이 다수의 치환을 허용했다. F64는 완전히 가변성이었다. 모든 다른 가변 위치는, 가능하게는 이온성 효과에 기인하여, 산성 아미노산 D 및 E에 대해 명료한 우선성을 나타냈다.

[0256]

[표 7]

[0257] 치환된 ApoC3 펩티드에 대한 6A6의 친화성

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

[0258]

제1 열은 야생형 ApoC3 펩티드 중의 아미노산 위치를 나타낸다. 제1 칼럼은 특정 아미노산 치환을 나타낸다.

[0259] [0260] 전센서스 모티브 GWVTDGFSSLK(서열번호 2)는, 애피토프와 14C7 항체 사이의 상호작용에 중요한 아미노산 잔기를

동정하기 위해 치환 스캐닝에 의해 추가로 분석했다. 13개 aa 사이클릭 구속된 웨티드의 어레이를 합성했다. 어레이의 각 행에서, 웨티드 ARGWVTDGFSSLK(서열번호 45) 중의 단일 아미노산 잔기가 치환되었고, 치환 잔기는 어레이의 컬럼에 의해 나타냈다.

[0261]

표 8(야생형 ApoC3 웨티드(서열번호 45)에 대한 결합의 퍼센트로서 표시된 친화성) 및 치환 매트릭스(도 7, 파트 C)에 제시된 바와 같이, 치환 어레이에 대한 14C7의 결합은 성숙 huApoC3(서열번호 1)의 T44 및 S49가 mAb 14C7의 결합에 필수적이고 결합에서 완전한 또는 거의 완전한 순서 없이 임의의 다른 아미노산에 의한 교환을 허용하지 않음을 입증했다. 아미노산 G41 및 G46은 고도로 보존되었고, E, N 또는 Q에 의한 G41의 치환은 약 70% 이상의 스팟 강도의 감소를 유발한 반면, N에 의한 G46의 교환은 거의 허용되지 않았고 90% 감소된 스팟 강도를 가져왔다. 아미노산 위치 F47 및 L50은 또한 고도의 서열 보존을 나타냈고, 스팟 강도의 현저한 감소와 함께 Y(F47) 또는 기타 소수성 아미노산 F 및 W(L50)에 의한 보존된 교환만을 허용했다. 또한, 아미노산 위치 V43, D45 및 K51은 야생형 아미노산에 대해 명료한 우선성, 및 R(K51) 뿐만 아니라 특히 Y, F 및 I(V43), A, E 및 K(D45)에 의한 보존적 교환에 대해 어느 정도의 허용과 함께 충분히 보존되었다. 이들 교환은 스팟 강도에서 30-55% 감소를 가져온 반면, 다른 아미노산 교환은 보다 덜 허용되었다. 그러나, Y에 의한 V43의 치환은 스팟 강도를 2배 증가시켰다. 아미노산 위치 W42 및 48S는 불충분하게 보존되거나 심지어 가변성이었고; 양 위치는 다수의 아미노산 교환에 감수성이었고, F, S 및 T(W42) 또는 E(S48)에 의한 교환은 심지어 스팟 강도의 2배 내지 3배 증가를 유발했다. 아미노산 위치 A39 및 R40은 가변성이었다.

[0262]

[표 8]

[0263]

치환된 ApoC3 펩티드에 대한 14C7의 친화성

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

[0264]

제1 열은 야생형 ApoC3 펩티드 중의 아미노산 위치를 나타낸다. 제1 열은 특정 아미노산 치환을 나타낸다.

[0265]

7.3 재료 및 방법

[0266]

ApoC3 서열은 절단된 펩티드를 회피하기 위해 C- 및 N-말단에서 중성 GSGSGSG(서열번호 46)에 의해 신장시켰다. 신장된 서열은 6, 9 및 12개 아미노산의 펩티드-펩티드 중첩을 갖는 7, 10 및 13개 아미노산 펩티드로 번역했다. Pepperchip® 플랫폼을 통한 펩티드 합성 후, 모든 펩티드를 C-말단 시스테인 측쇄 티올 그룹 및 적절하게 변형된 N-말단 사이의 티오에테르 결합을 통해 폐환시켰다. 수득된 사이클릭 ApoC3 펩티드 마이크로어레이에는 이중으로 인쇄된(504개 펩티드 스팟) 252개의 상이한 사이클릭 구속된 펩티드를 함유했고, 추가의 HA 대조군 펩티드(YPYDVPDYAG(서열번호 112), 80개 스팟)에 의해 프레임화했다.

[0267]

세척 완충제에서 15분 및 차단 완충제에서 30분 예비-팽윤시킨 후, ApoC3 펩티드 마이크로어레이 카피 중의 하나를 1:5000의 희석으로 이차 항체 염소 항-인간 IgG (Fc) DyLight680 및 1:2000의 희석으로 대조군 항체 마우

스 모노클로날 항-HA (12CA5) DyLight800과 함께 실온에서 45분 동안 배양하여 항원-유래된 펩티드와의 배경 상호작용을 분석했다. 7/7(적색/녹색)의 스캐닝 강도에서, 본 발명자들은 휘도 및 콘트라스트(조정된 스캔 참조)의 현저한 증가에도 ApoC3 펩티드를 갖는 이차 및 대조군 항체와의 어떠한 배경 상호작용을 관찰하지 못했다. 마우스 모노클로날 항-HA(12CA5) DyLight800 대조군 항체는 펩티드 마이크로어레이를 프레임화하는 예상된 양호하게-규정된 HA 대조군 스팟 패턴을 제공하고, 전체 펩티드 마이크로어레이 완전성 및 검정 품질을 검증했다.

[0269] ApoC3 펩티드 마이크로어레이 중의 하나의 예비-염색을 이차 항체 염소 항-인간 IgG(Fc) DyLight680(1:5000) 및 대조군 마우스 모노클로날 항-HA(12CA5) DyLight800(1:2000)으로 수행하여, 주요 검정을 간접할 수 있는 항원-유래된 펩티드와 이차 항체와의 배경 상호작용을 조사했다. 다른 ApoC3 펩티드 마이크로어레이와 항체 샘플과의 후속 배양에 계속하여, 7/7(적색/녹색)의 스캐닝 강도에서의 관독 뿐만 아니라 이차 및 대조군 항체를 사용한 염색을 수행했다. 펩티드 어레이를 프레임화하는 추가 HA 펩티드를 내부 품질 관리로서 염색하여 검정 품질 및 펩티드 마이크로어레이 완전성을 확인했다.

[0270] 스팟 강도 및 펩티드 주석의 정량화는, 24-비트 칼라 tiff 파일보다 높은 동적 범위를 나타내는 7/7의 스캐닝 강도에서 16-비트 그레이 스케일 tiff 파일에 기초했고; 마이크로어레이 이미지 분석은 PepSlide® 분석기로 수행하고, 재료 및 방법에 수록된 엑셀 파일로 요약했다. 소프트웨어 알고리즘은 각 스팟의 형광 강도를 생, 전경 및 배경 신호로 분해하고, 스팟 복제의 평균 중앙 전경 강도 및 스팟-대-스팟 편차 편차를 계산한다. 평균 중앙 전경 강도에 기초하여, 강도 맵을 생성하고, 펩티드 맵에서의 상호작용은 높은 스팟 강도에 대해 적색 및 낮은 스팟 강도에 대해 백색으로 강도 칼라 코드에 의해 강조했다. 본 발명자들은 40%의 최대 스팟-대-스팟 편차를 허용했지만; 상용하는 강도 값을 0으로 설정했다.

[0271] 본 발명자들은 추가로 전체 스팟 강도 및 신호-대-노이즈 비율을 가시화하기 위해 N-말단으로부터 C-말단까지 ApoC3 서열에 대한 항체 샘플을 사용하여 검정의 평균 스팟 강도를 플로팅했다. 강도 플롯은, 항체 샘플에 의해 인식된 에피토프를 동정하기 위해, 마이크로어레이 스캔의 육안 검사 뿐만 아니라, 펩티드 및 강도 맵과 상관시켰다. 항체 결합에 기여하는 아미노산을 동정하여 강조했다.

실시예 8: 항-ApoC3 항체 5E5에 의한 식후 트리글리세리드의 감소

8.1 AAV8-huApoC3 마우스 모델의 생산 및 특성화

[0272] 본 실시예에서, 본 발명자들은 먼저 마우스 모델 발현 인간 ApoC3을 생산하고 특성화했다. 마우스(C57BL/6)는 인간 ApoC3 유전자를 함유하는 AAV8 벡터의 3×10^{11} 바이러스 입자, 또는 비히를 대조군으로 감염시켰다. 감염 14일 후, AAV8-huApoC3 마우스의 평균 혈청 huApoC3 수준은 $5.7 \mu M$ 이었다. 4시간 절식후 순환 트리글리세리드 수준은, 대조군 마우스에서 109 mg/dL 과 비교하여, 이를 마우스에서 163 mg/dL 이었다($p=0.0065$). 경구 지질 부하의 제거에 대한 증가된 huApoC3의 영향을 측정하기 위해, 올리브유의 경구 용량(체중 g당 $10 \mu L$)을 AAV 또는 비히를 주사 14일 후에 마우스에게 제공했다. 혈청 트리글리세리드 수준은 시간 경과에 따라 측정했다. 트리글리세리드 중의 식후 증가는 실험의 실험 경과에 걸쳐 AAV8-huApoC3 마우스에서 보다 높았고(도 8, 파트 A), AAV-huApoC3 마우스에서 시간에 따른 트리글리세리드 수준의 곡선하 면적(AUC)은 38% 더 높았다(대응하지 않는 T 시험으로 $p=0.0047$)(도 8, 파트 B). 함께 고려하면, 3×10^{11} AAV8-huApoC3 바이러스 입자의 주사는 마우스에서 손상된 트리글리세리드 제거를 유도했고, 항-ApoC3 항체를 특성화하기 위한 동물 모델로서 작용할 수 있다.

8.2 마우스 모델에서 식후 고지혈증에 대한 5E5 효과의 특성화

[0273] 본 실시예는 마우스 모델에서 식후 트리글리세리드를 감소시키는데 있어서 mAb 5E5의 생체내 유효성을 기재한다. 3×10^{11} AAV8-huApoC3을 제공받은 마우스를 사용하여, 식이로부터 흡수되고 카이로미크론에 팩키징되는 식후 트리글리세리드의 감소에서 항-ApoC3 항체 5E5를 특성화한다. 도 9, 파트 A에 제시된 바와 같이, 5E5 항체의 투여는 혈청 트리글리세리드의 식후 서지의 현저한 감소를 유도했다. 식후 트리글리세리드의 증가된 수준은 약 0까지 감소되었고, 시간에 따른 트리글리세리드 수준의 곡선하 면적은 0.030의 p 값과 함께 약 25% 감소되었다(도 9, 파트 B). ApoC3의 혈청 수준은 올리브유 투여 2시간 및 3시간 후에 5E5의 존재하에 유의적으로 감소한 반면(도 9, 파트 C), 5E5 항체 자체의 혈청 수준은 초기 분배 상 후에 서서히 저하했다(도 9, 파트 D).

8.3 재료 및 방법

[0274] 본 실시예에 사용된 인간 AAV8-ApoC3 바이러스 벡터는 RegenXbio(Rockville Maryland)로부터 수득했다. 60 내지 63일령의 24마리 C57BL/6 수컷 마우스(Charles River)를 물에의 자유로운 접근 및 표준 고형 사료(Lab Diet;

5001)에 대한 자유로운 접근과 함께 일정한 12시간 명상태; 12시간 암상태 사이클로 유지시켰다. 마우스당 3×10^{11} 바이러스 입자의 복강내 투여 12일 후에, 마우스를 후안 부비동 채혈하고, 동등한 평균 ApoC3 수준에 따라 그룹으로 위치시켰다. 14일차에, 마우스를 6시간 동안 절식시키고, 후안 부비동으로부터 $25\mu\text{l}$ 의 혈액을 수집하여 트리글리세리드 기준선을 확립했다. IgG1 포맷의 25mg/kg 5E5 항체를 복강내로 주사하고, 즉시 올리브유의 $250\mu\text{l}$ 경구 볼러스를 주사했다(Sigma #01514). 마우스는 후안 부비동을 통해 채혈하여, 올리브유 투여후 15, 30, 60, 120 및 240분에서 혈장 트리글리세리드, ApoC3 및 시험 항체의 농도를 측정했다. 측정된 값을 시간의 함수로서 플로팅하고, 혈장 트리글리세리드에 대한 곡선하 면적(AUC)은 GraphPad Prism을 사용하여 계산했다. 모든 동물 연구는 국립 위생 연구소의 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침의 권고에 따라 수행했다. 모든 절차는 바스쿠냅, 엘엘씨(Vascumab, LLC)의 시설내 동물 관리 사용 위원회에 의해 승인되었다.

[0279] 트리글리세리드는 흑색 96-웰 플레이트(Costar # 3915)에서 $200\mu\text{M}$ Amplex Red(AAT Bioquest)가 보충된 $150\mu\text{L}$ Thermo Scientific™ 트리글리세리드 시약(TR22421)과 함께 $5\mu\text{l}$ 의 EDTA-혈장을 배양함으로써 분석했다. 30°C 에서 10분 후, 플레이트를 판독하고(ex 560nm; em 585nm), 농도를 글리세롤 표준 곡선의 4-파라미터 피트(Molecular Devices)로부터 계산했다.

[0280] ApoC3 수준은 ELISA 검정으로 측정했다. 96-웰 플레이트(Griener # 655061)를 PBS에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 일차 ApoC3 항체(Abcam 래빗 폴리클로날 항-인간 ApoC3 #ab21032)로 밤새 4°C 에서 코팅했다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, 90분 동안 30°C 에서 $200\mu\text{l}$ 의 차단 완충제(PBS 중의 Pierce Clear Milk Blocker # 37587)로 차단시켰다. 차단 완충제를 제거하고, 차단 완충제에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 의 시험 샘플을 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 2시간 동안 실온에서 배양시켰다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, 차단 완충제에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 이차 항체(Abcam 염소 폴리클로날 비오틴-접합체 ApoC3 # ab21024)를 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 플레이트를 TBS-T로 1회 세척하고, PBS에서 100배 희석시킨 $50\mu\text{l}$ SA-HRP(Abcam # 34028)를 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 30분 동안 실온에서 배양시켰다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, $80\mu\text{l}$ TMB(Thermo Ultra-TMB ELISA #34028), 이어서 $50\mu\text{l}$ 0.5N HCL로 현상했다. 흡광도는 450nm에서 판독했다. 시험 웰 중의 ApoC3의 양은 정제된 ApoC3(Athens Research and Technology)을 사용하여 작성된 표준 곡선(Molecular Devices)의 4-파라미터 피트로부터 계산했다.

[0281] 5E5 항체의 수준은 ELISA 검정으로 측정했다. 96-웰 플레이트(Griener # 655061)는 PBS에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 일차 IgG 항체(Fitzgerald 41-XG57 염소 항-인간 IgG Fc 폴리클로날)로 4°C 에서 밤새 코팅했다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, PBS 중의 3% BSA(Roche BSA 분획 V 프로테아제 비합유 # 03 117 332 001) + 청명한 분유(Pierce Clear Milk Blocker # 37587)로 이루어진 $200\mu\text{l}$ 의 차단 완충제로 90분 동안 30°C 에서 차단시켰다. 차단 완충제를 제거하고, 차단 완충제에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 의 시험 샘플을 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 실온에서 2시간 동안 배양시켰다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, 차단 완충제에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 이차 항체(Abcam 염소 항-인간 IgG-Fc (비오틴) 폴리클로날 # ab97223)을 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 플레이트를 TBS-T로 1회 세척하고, PBS에서 100배 희석시킨 $50\mu\text{l}$ SA-HRP(Abcam # 34028)를 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 30분 동안 RT에서 배양시켰다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, $80\mu\text{l}$ TMB(Thermo Ultra-TMB ELISA #34028), 이어서 $50\mu\text{l}$ 0.5N HCL로 현상했다. 흡광도는 450nm에서 판독했다. 시험 웰 중의 IgG의 양은 정제된 시험 항체를 사용하여 작성한 표준 곡선(Molecular Devices)의 4-파라미터 피트로부터 계산했다.

0282] 실시예 9: 마우스 모델에서 5E5 및 6A6 항체에 의한 ApoC3 및 ApoB의 감소

[0283] 인간 ApoC3을 발현하는 마우스를 생성하고, 셱션 8.1에 기재된 바와 같이 처리했다. AAV 감염 12일 후, 혈액 샘플을 후안 부비동으로부터 수집하여 기준선(T=0) 인간 ApoC3 및 마우스 ApoB 수준을 확립했다. 이어서, 마우스는 모든 그룹이 T0에서 유사한 평균 ApoC3 수준을 갖도록 그룹화했다. IgG1 포맷에서 25mg/kg의 5E5 항체의 단일 용량 또는 20mg/kg의 6A6 항체의 단일 용량은 초기 AAV 감염 14일 후에 배부 피하 공간에 주사에 의해 각 마우스에게 투여했다. 혈액 샘플을 시험 항체 투여 0, 2, 4, 8 및 24시간 후 및 이후 30일 동안 대략 2일마다 후안 부비동으로부터 수집했다. 모든 동물 연구는 국립 위생 연구소의 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침의 권고에 따라 수행했다.

[0284] 인간 ApoC3 및 마우스 ApoB의 혈장 수준은 ELISA 검정으로 측정했다. 구체적으로, 96-웰 플레이트(Griener # 655061)는 PBS에서 희석시킨 $50\mu\text{l}$ 일차 ApoC3 항체(Abcam 래빗 폴리클로날 항-인간 ApoC3 #ab21032) 또는 $50\mu\text{l}$ 일차 ApoB 항체(Meridian Life Sciences 염소 폴리클로날 항-인간 ApoB #K45253G)로 밤새 4°C 에서 코팅했다. 플레이트를 $200\mu\text{l}$ TBS-T로 4회 세척하고, $200\mu\text{l}$ 의 차단 완충제(PBS 중의 Pierce Clear Milk Blocker #

37587)로 90분 동안 30°C에서 차단시켰다. 차단 완충제를 제거하고, 차단 완충제에서 희석시킨 50 μL의 시험 샘플을 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 2시간 동안 실온에서 배양시켰다. 플레이트를 200 μL TBS-T로 4회 세척하고, 차단 완충제에서 희석시킨 50 μL 이차 ApoC3 항체(Abcam 염소 폴리클로날 비오틴-접합체 ApoC3 # ab21024) 또는 이차 ApoB 항체(Meridian Life Sciences 염소 폴리클로날 비오틴-접합체 ApoB48/100 # 34003G)를 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 플레이트를 TBS-T로 1회 세척하고, PBS에서 100배 희석시킨 50 μL SA-HRP(Abcam # 64269)를 첨가하고, 300rpm에서의 회전으로 30분 동안 실온에서 배양시켰다. 이어서, 플레이트를 200 μL TBS-T로 4회 세척하고, 80 μL TMB(Thermo Ultra-TMB ELISA #34028), 이어서 50 μL 0.5N HCl로 현상했다. 흡광도는 450nm에서 관찰했다. 시험 웰 중의 ApoC3의 양은 정제된 ApoC3(Athens Research and Technology)을 사용하여 작성한 표준 곡선(Molecular Devices)의 4-파라미터 피트로부터 계산했다. 시험 웰 중의 ApoB의 양은 원심분리에 의해 단리된 마우스 VLDL을 사용하여 작성한 표준 곡선(Molecular Devices)의 4-파라미터 피트로부터 계산했다(ApoB 함량은 전체 단백질 함량의 20%인 것으로 가정된다).

[0285] 도 10에 제시된 바와 같이, 5E5 항체(파트 A 및 B) 및 6A6 항체(파트 C 및 D)는 음성 대조군 그룹에서 상응하는 수준과 비교하여 1 내지 2일 동안 인간 ApoC3 및 마우스 ApoB의 혈장 수준을 유사하게 감소시켰다. ApoC3의 혈장 수준은 5E5 및 6A6 항체(파트 A 및 C)의 투여 4 내지 8시간후 50% 이상 감소되었다. ApoB의 혈장 수준은 5E5 및 6A6 항체(파트 B 및 D)의 투여 4 내지 8시간후 약 40 내지 50% 감소되었다.

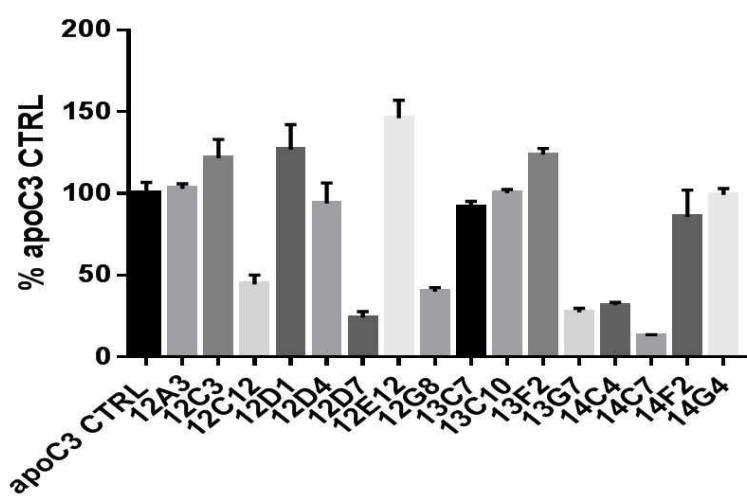
[0286] 본 발명은 본원에 기재된 특정 실시형태에 의해 범위를 한정시키는 것은 아니다. 실제로, 기재된 것들에 추가하여 본 발명의 다양한 변형이 전술한 기재 및 첨부의 도면으로부터 당해 기술분야의 숙련가에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0287] 본원에서 인용된 모든 참조문헌(예: 공보 또는 특허 또는 특허원)은, 각각의 개개 참조문헌(예: 공보 또는 특허 또는 특허원)이 모든 목적을 위해 이의 전체가 참조로서 도입되는 것을 구체적으로 및 개별적으로 지시하는 바와 동일한 정도로 이들의 전체가 모든 목적을 위해 본원에서 참조로서 도입된다.

[0288] 기타 실시형태는 하기 특허청구범위 내에 있다.

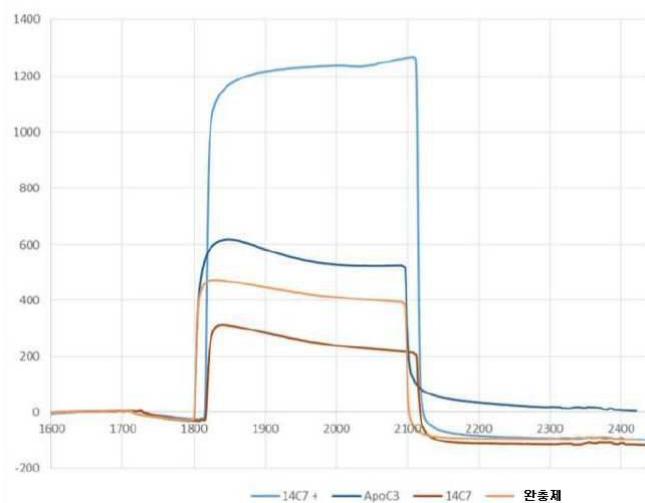
도면

도면1



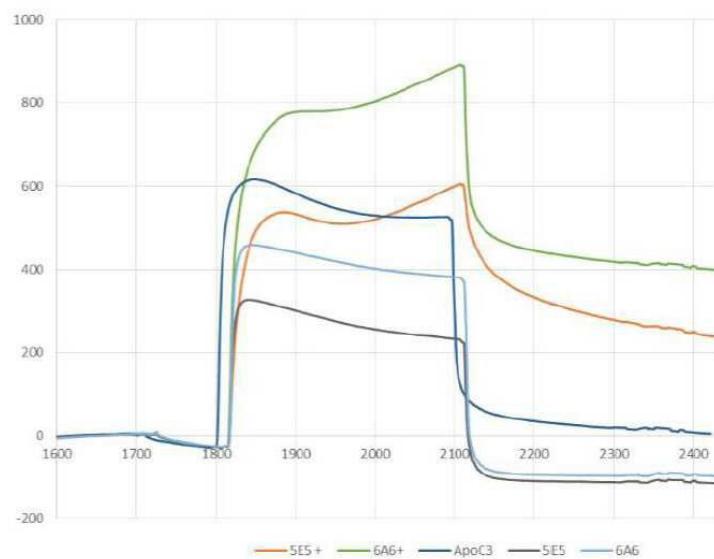
도면2a

A



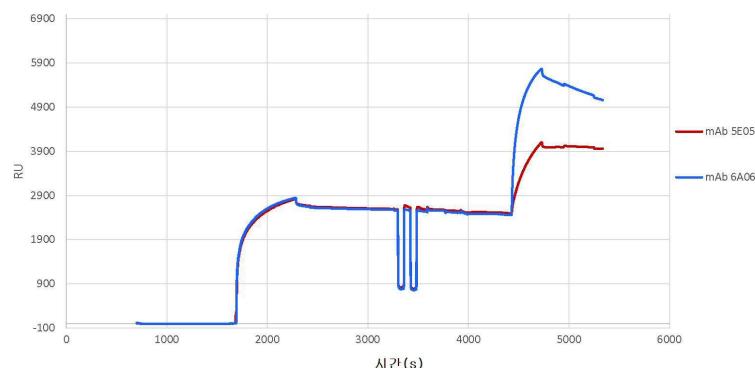
도면2b

B

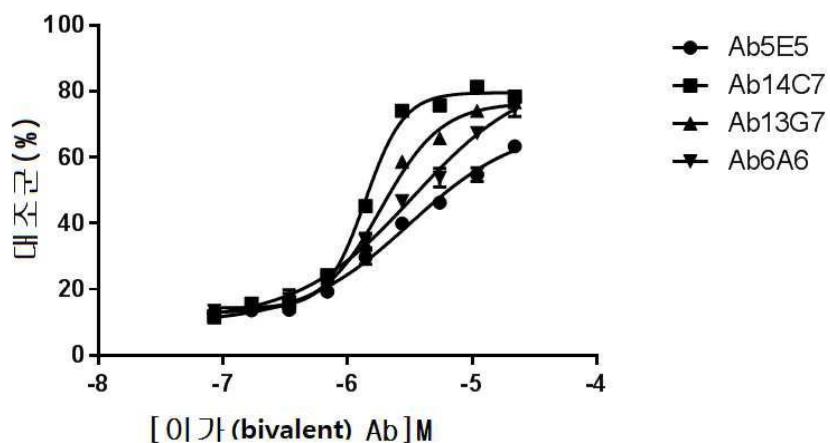


도면2c

C

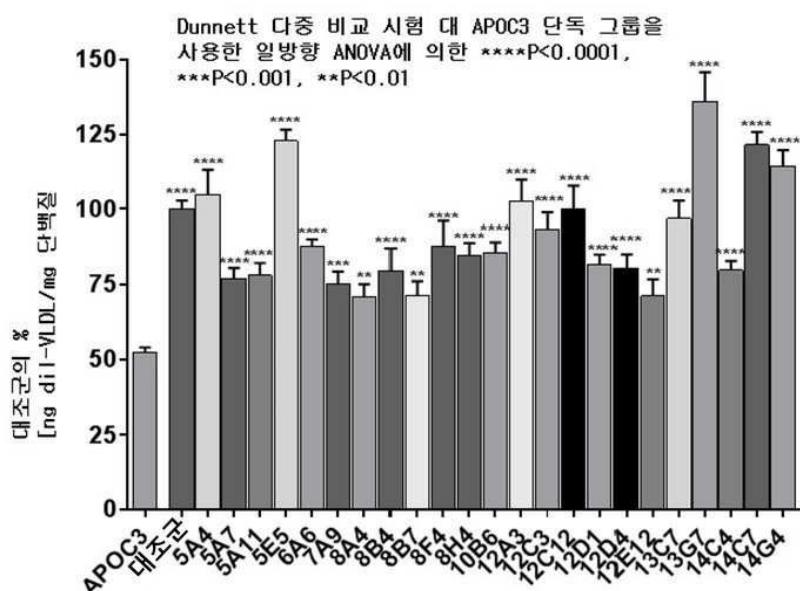


도면3



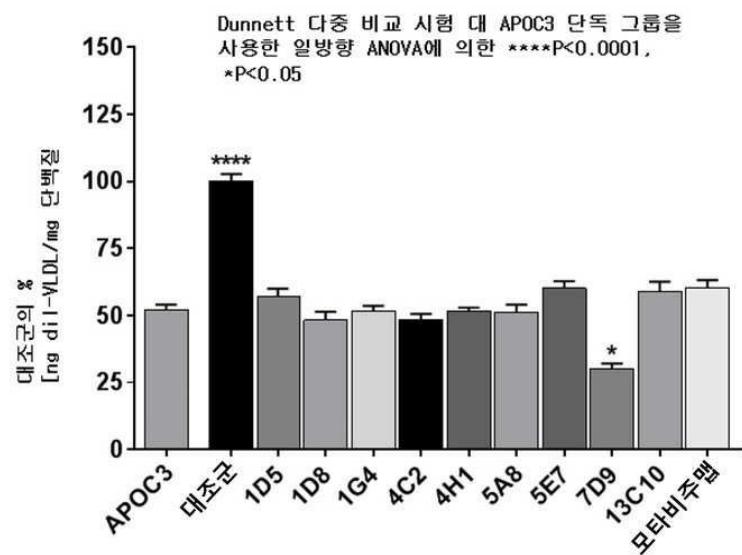
도면4a

A



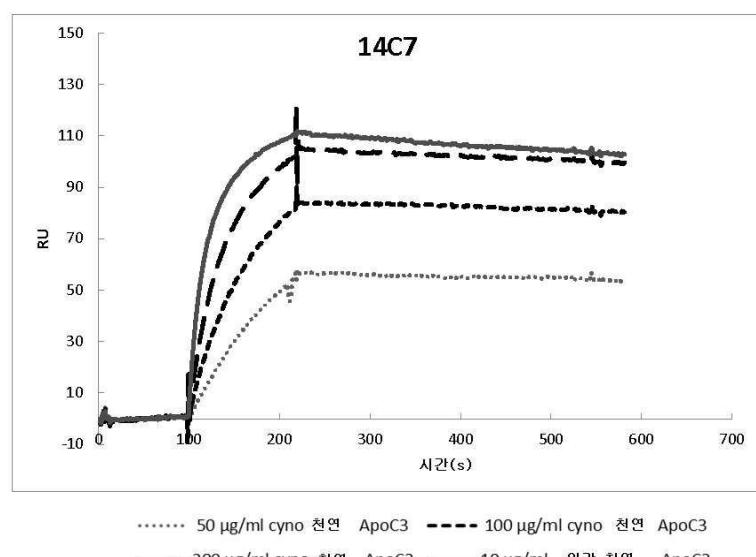
도면4b

B



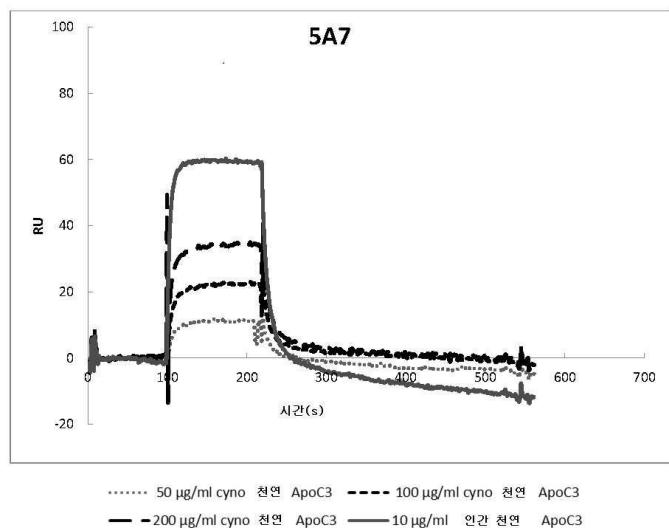
도면5a

A



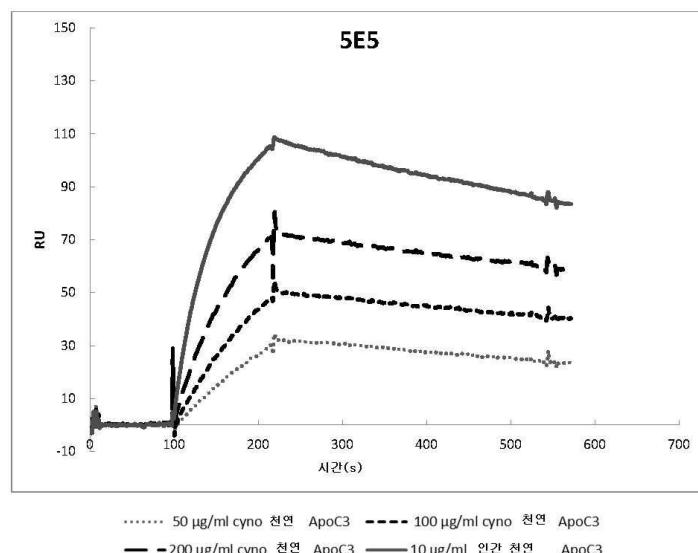
도면5b

B



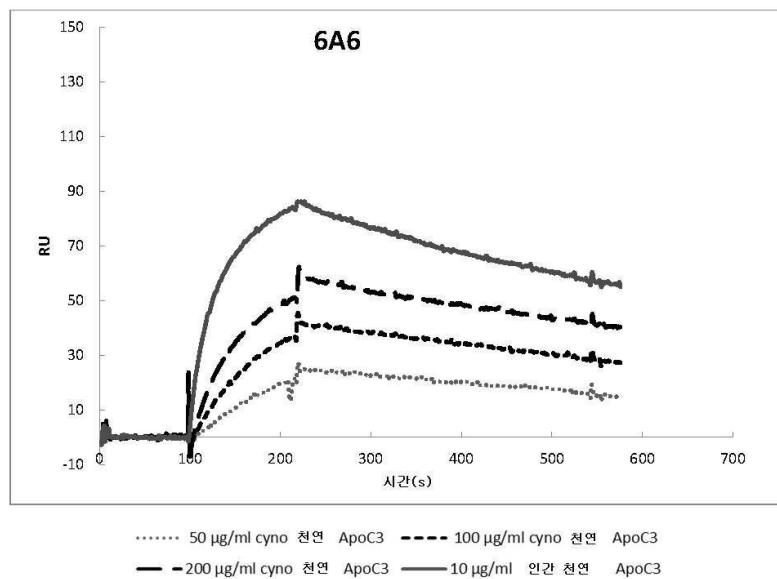
도면5c

C



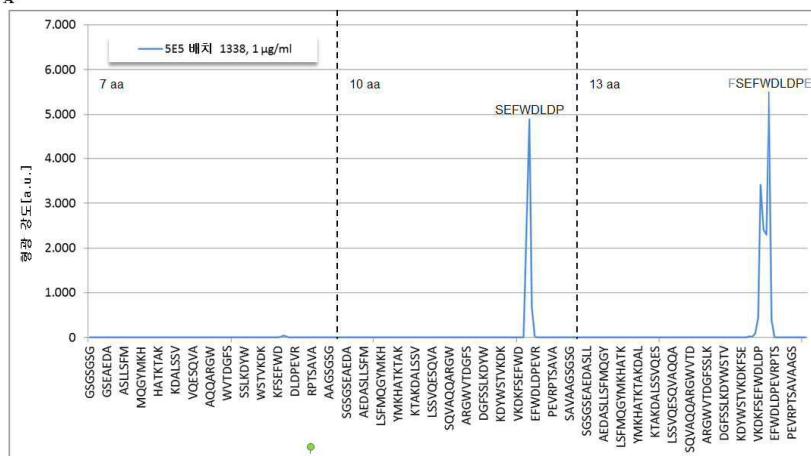
도면5d

D



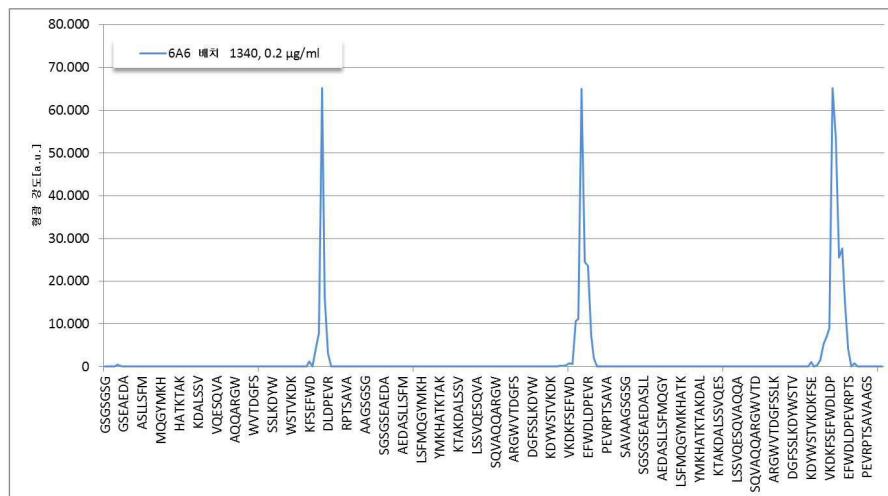
도면6a

A



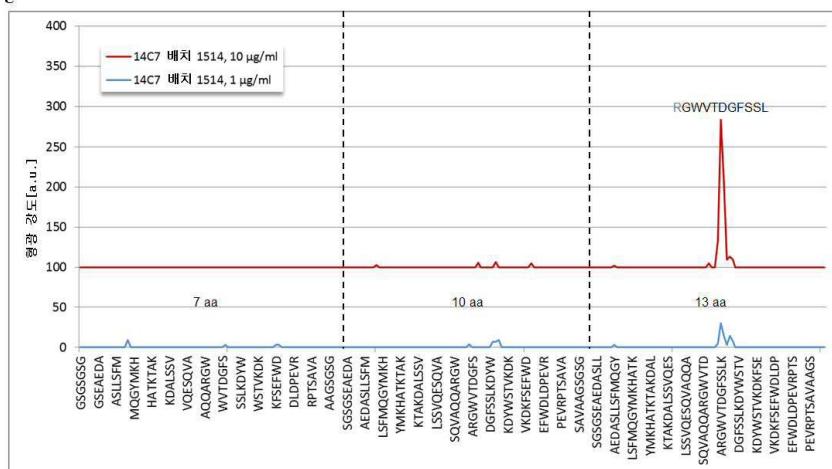
도면6b

B



도면6c

C



도면7a

A

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

도면7b

B

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

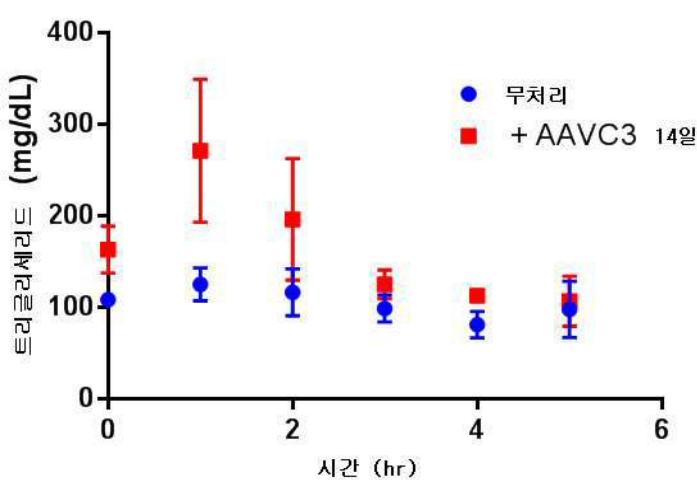
도면7c

C

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

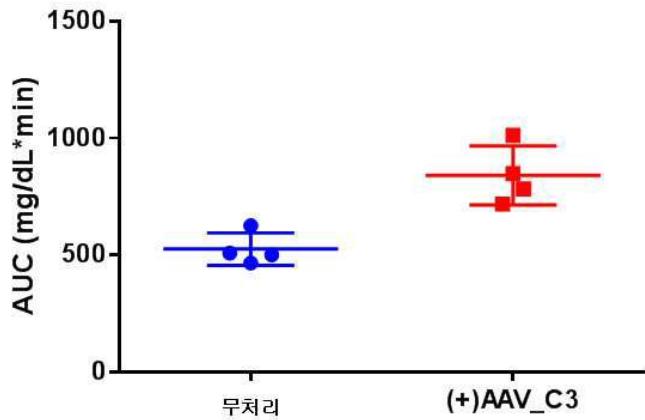
도면8a

A



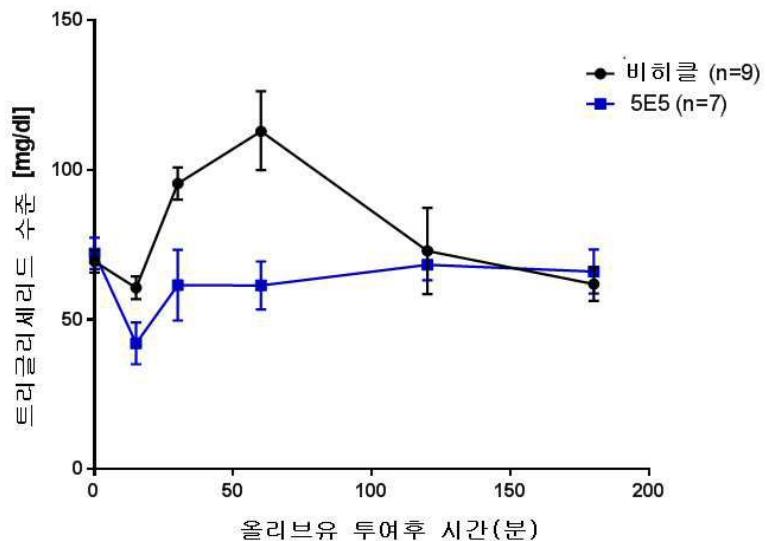
도면8b

B

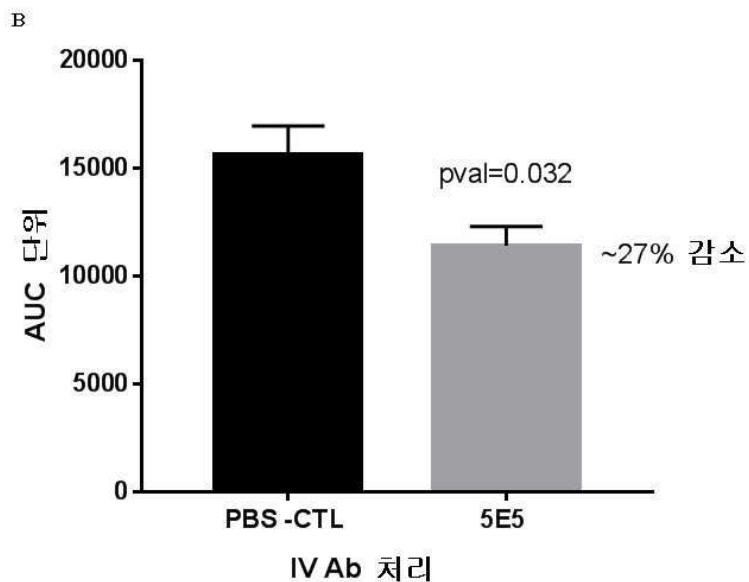


도면9a

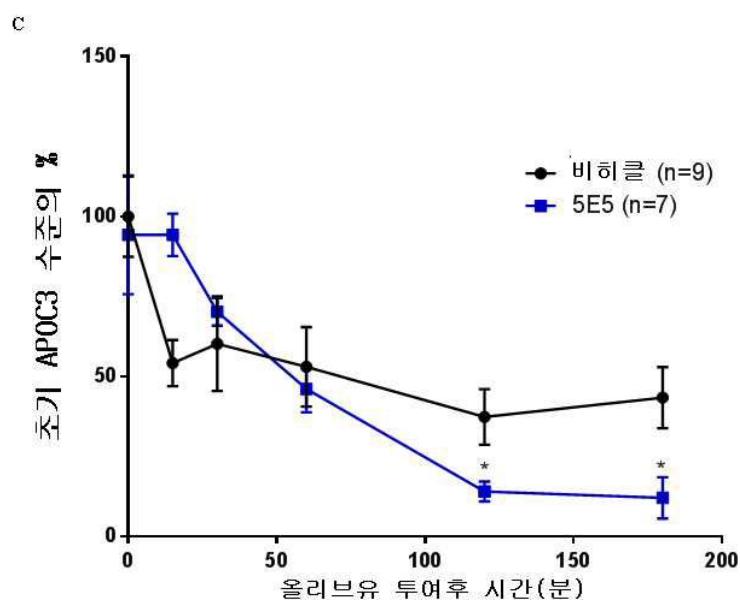
A



도면9b

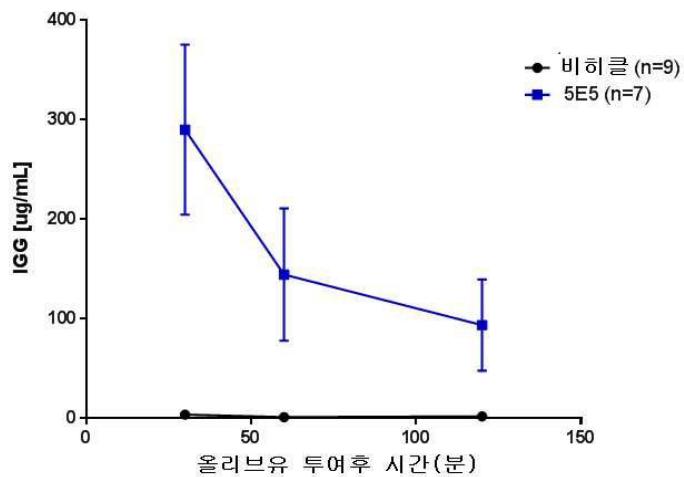


도면9c



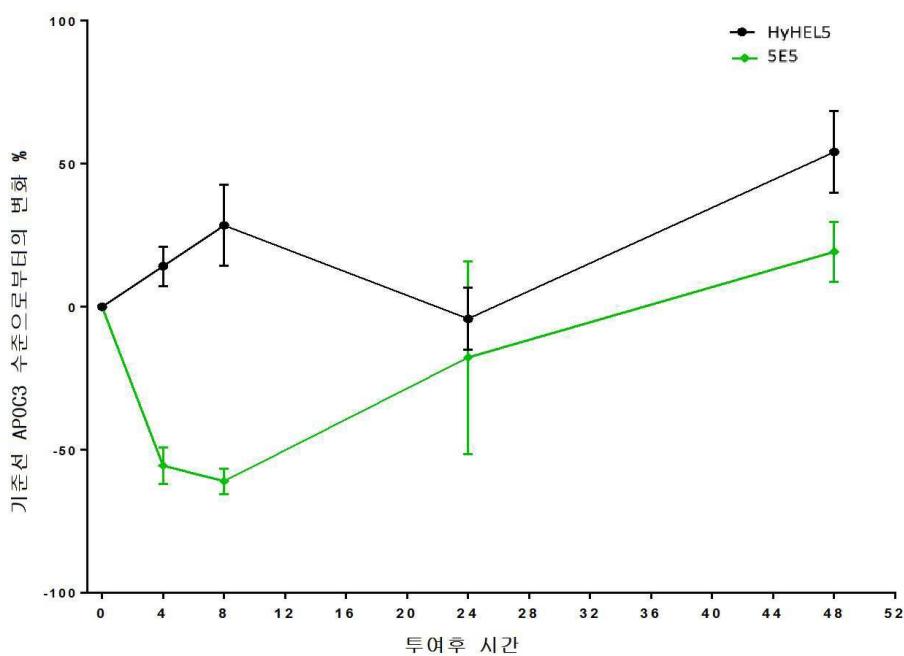
도면9d

D



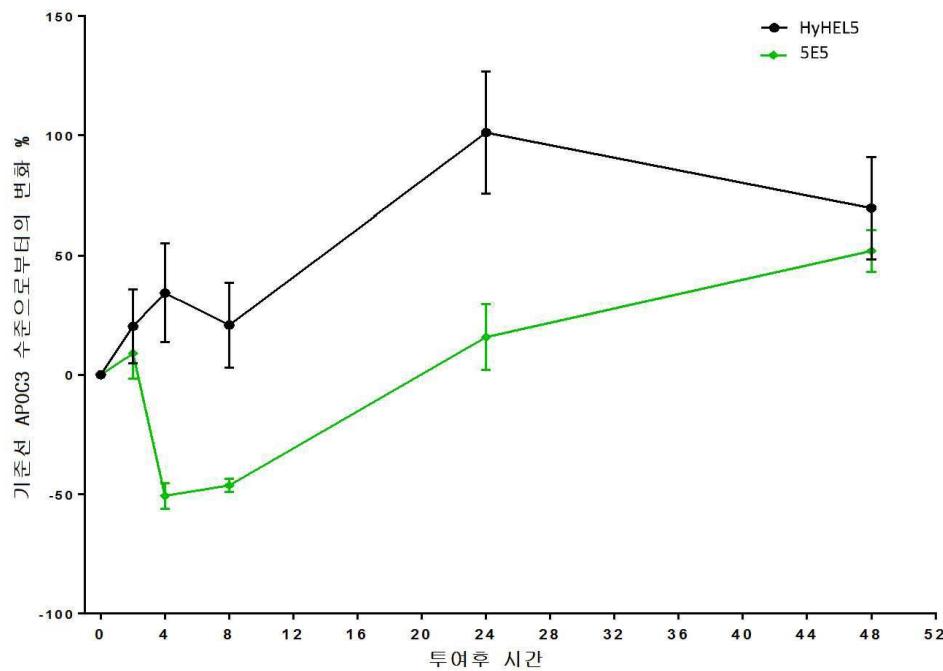
도면10a

A



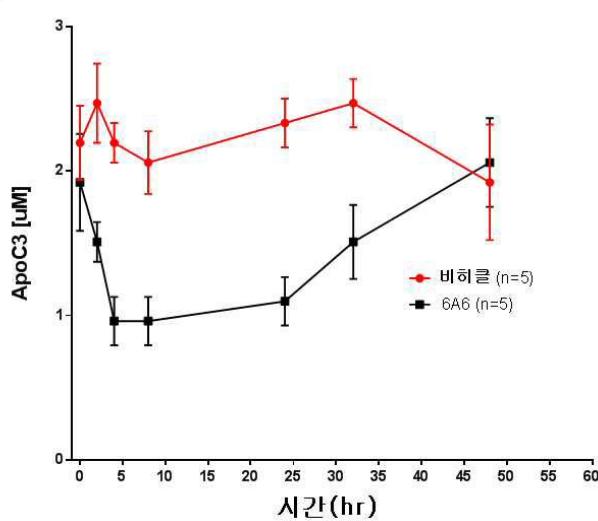
도면10b

B



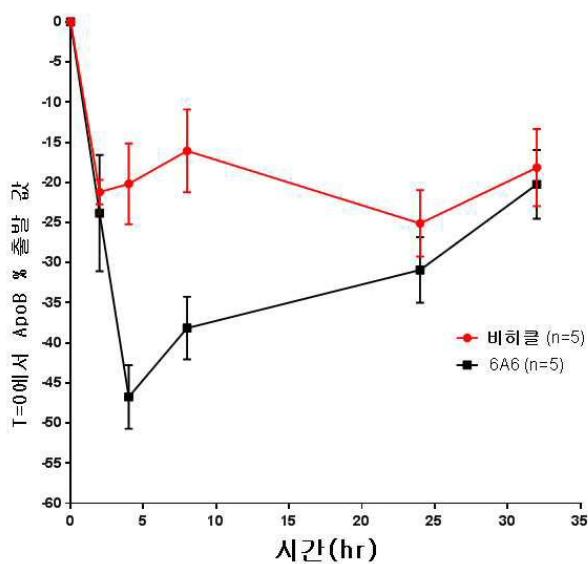
도면10c

C



도면10d

D



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> STATEN BIOTECHNOLOGY B.V.

<120> ANTI-APOC3 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> IPA190002-US

<150> US 62/360,084

<151> 2016-07-08

<150> US 62/491,591

<151> 2017-04-28

<160> 183

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Glu Ala Glu Asp Ala Ser Leu Leu Ser Phe Met Gln Gly Tyr Met

1 5 10 15

Lys His Ala Thr Lys Thr Ala Lys Asp Ala Leu Ser Ser Val Gln Glu

20

25

30

Ser Gln Val Ala Gln Gln Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser

35 40 45

Ser Leu Lys Asp Tyr Trp Ser Thr Val Lys Asp Lys Phe Ser Glu Phe

50 55 60

Trp Asp Leu Asp Pro Glu Val Arg Pro Thr Ser Ala Val Ala Ala

65 70 75

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Ser Glu Phe Trp Asp Leu Asp Pro Glu

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 CDRH1

<400> 4

Thr Arg Tyr Tyr Ala

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 CDRH2

<400> 5

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

1 5 10 15

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 CDRH3

<400> 6

Val Arg Leu Ile Glu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 CDRH1

<400> 7

Thr Tyr Ser Met Arg

1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 CDRH2

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 CDRH3

<400> 9

Ala Gly Tyr Ser Asp

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 CDRH1

<400> 10

Ser Tyr Ala Gly Arg

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 CDRH2

<400> 11

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 CDRH3

<400> 12

Asn Ser Tyr Arg Tyr

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 CDRH1

<400> 13

Ser Tyr Ser Met Tyr

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

8F4 CDRH2

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 CDRH3

<400> 15

Gln Gly Tyr Gly Thr

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 CDRH1

<400> 16

Ser Tyr Ser Met Arg

1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 CDRH2

<400> 17

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

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 CDRH3

<400> 18

Gln Gly Tyr Ile Asn

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 CDRH1

<400> 19

His Tyr Thr Met Tyr

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 CDRH2

<400> 20

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

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 CDRH3

<400> 21

Gln Gly Tyr Glu Tyr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 CDRH1

<400> 22

Asn Arg Arg Tyr Ala

1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 CDRH2

<400> 23

Val Ile Val Tyr Asp Gly Asn Thr His Val Ser Pro Ser Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 CDRH3

<400> 24

Val Leu Leu Leu Arg Asp Pro Leu Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8A4 CDRH1

<400> 25

Asn Tyr Ala Met Arg

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8A4 CDRH2

<400> 26

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

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8A4 CDRH3

<400> 27

Gln Gly Tyr Ile Phe

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 CDRH1

<400> 28

Asn Ala Tyr Leu Tyr

1 5

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 CDRH2

<400> 29

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

1 5 10 15

Gly

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 CDRH3

<400> 30

Ala Ser Arg Val Val Ala Tyr Asp Ser

1 5

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8H4 CDRH2

<400> 31

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

1 5 10 15

Gly

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8H4 CDRH3

<400> 32

Gln Gly Tyr Thr Asp

1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10B6 CDRH1

<400> 33

Ser Tyr Ala Met Arg

1 5

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10B6 CDRH2

<400> 34

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

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10B6 CDRH3

<400> 35

Gln Gly Tyr Ile Tyr

1 5

<210> 36

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 CDRH2

<400> 36

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

1 5 10 15

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 CDRH3

<400> 37

Gln Gly Phe Val Tyr

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C3 CDRH1

<400> 38

Ser Tyr Ser Met Phe

1 5

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C3 CDRH2

<400> 39

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

1 5 10 15

Asp

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C3 CDRH3

<400> 40

Gln Gly Tyr Ala Tyr

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12 CDRH1

<400> 41

Thr Ser Tyr Tyr Ala Trp Thr

1 5

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12 CDRH2

<400> 42

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

1 5 10 15

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12 CDRH3

<400> 43

Ser Tyr Gly Leu Gly Leu Tyr Asp Leu

1 5

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

1 5 10

<210> 45

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Arg Gly Trp Val Thr Asp Gly Phe Ser Ser Leu Lys

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 46

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 CDRH1

<400> 47

Ser Ser Asn Met Arg

1 5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 CDRH2

<400> 48

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

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 CDRH3

<400> 49

Ala Gly Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 CDRH1

<400> 50

Asn Ile Tyr Met Ser

1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 CDRH2

<400> 51

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

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 CDRH3

<400> 52

Gly Glu Val Asp

1

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 CDRH1

<400> 53

Arg Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 CDRH2

<400> 54

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

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 CDRH3

<400> 55

Ala Leu Arg Ala Glu Tyr Asp Tyr

1 5

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 CDRH1

<400> 56

Thr Thr Ala Pro Ala Trp Gly

1 5

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 CDRH2

<400> 57

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

1 5 10 15

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 CDRH3

<400> 58

Leu Gly Gly Arg Asn Tyr Pro Pro Tyr Val Glu Leu

1 5 10

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C4 CDRH1

<400> 59

Asn Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 60

<211> 17

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C4 CDRH2

<400> 60

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

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C4 CDRH3

<400> 61

Ala Asn Leu Gly Leu

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C7 CDRH1

<400> 62

Thr Asn Ser Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C7 CDRH2

<400> 63

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

1 5 10 15

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C7 CDRH3

<400> 64

Arg Ile Pro Thr Gly Glu Tyr

1 5

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14G4 CDRH1

<400> 65

Arg Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 66

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14G4 CDRH2

<400> 66

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

1 5 10 15

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14G4 CDRH3

<400> 67

Gly His Asn Met Asp Tyr

1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D7 CDRH1

<400> 68

Asp Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 69

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D7 CDRH2

<400> 69

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

1 5 10 15
<210> 70
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 12D7 CDRH3
<400> 70

Gly Pro Pro His Tyr Ile Pro Ile Pro Ser Met Thr Pro Arg Asp Ser
1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 12G8 CDRH2
<400> 71

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

1 5 10 15

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 12G8 CDRH3
<400> 72

His Arg Pro Gly Gly Ala Leu Asp Thr

1 5

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 5A11 CDRL1
<400> 73

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gly

1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 CDRL2

<400> 74

Ser Thr Ser Ser Arg His Ser

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 CDRL3

<400> 75

Ala Leu Asp Ile Gly Ser Tyr Ile Val

1 5

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 CDRL1

<400> 76

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

1 5 10 15

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 CDRL2

<400> 77

Gln Val Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 CDRL3

<400> 78

Ala Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro His Thr

1 5

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 CDRL1

<400> 79

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

1 5 10 15

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 CDRL2

<400> 80

Gln Val Ser Ser His Glu Ser

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 CDRL3

<400> 81

Ala Gln Ala Thr Tyr Asn Pro Arg Thr

1 5

<210> 82

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 CDRL1

<400> 82

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

1 5 10 15

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 CDRL2

<400> 83

Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 CDRL3

<400> 84

Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Gly His Ser

1 5

<210> 85

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 CDRL1

<400> 85

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

1 5 10 15

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 CDRL2

<400> 86

Gln Val Ser Asn Arg Glu Ser

1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 CDRL3

<400> 87

Ala Gln Gly Thr Tyr Asn Pro Lys Thr

1 5

<210> 88

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 CDRL1

<400> 88

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

1 5 10

15

<210> 89

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A4 CDRL2

<400> 89

Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 90

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 CDRL1

<400> 90

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

1 5 10

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 CDRL2

<400> 91

Asp Ile Asp Lys Arg Ala Ser

1 5

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 CDRL3

<400> 92

Ala Ala Tyr Gly Ser Arg Asp Asn Val Val

1 5 10

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8A4 CDRL2

<400> 93

Gln Val Ser Asn His Glu Ser

1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> 8A4 CDRL3

<400> 94

Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 CDRL1

<400> 95

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

1 5 10 15

Asn

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 CDRL2

<400> 96

Tyr Ala Ser Thr Gln Glu Ser

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 CDRL3

<400> 97

Gln Gln Ala Tyr Ser Ala Pro Phe Thr

1 5

<210> 98

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8H4 CDRL1

<400> 98

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

1 5 10 15

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8H4 CDRL2

<400> 99

Gln Val Ser Asn Arg Asp Ser

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8H4 CDRL3

<400> 100

Ala Gln Gly Thr Tyr Asn Pro Tyr Thr

1 5

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10B6 CDRL1

<400> 101

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

1 5 10 15

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10B6 CDRL3

<400> 102

Ala Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro His Ser

1 5

<210> 103

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 CDRL1

<400> 103

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

1 5 10 15

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 CDRL2

<400> 104

Gln Val Ser Asn Arg Ser Ser

1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 CDRL3

<400> 105

Ala Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Val Thr

1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C3 CDRL2

<400> 106

Gln Thr Ser Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C3 CDRL3

<400> 107

Ala Gln Ala Thr Tyr Ser Pro His Thr

1 5

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12 CDRL1

<400> 108

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

1 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12 CDRL2

<400> 109

Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser

1 5

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12 CDRL3

<400> 110

Ser Ser Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val

1 5 10

<210> 111

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D1 CDRL1

<400> 111

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

1 5 10 15

<210> 112

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA control peptide

<400> 112

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly

1 5 10

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D1 CDRL3

<400> 113

Ala Gln Ala Thr Tyr Pro His Thr

1 5

<210> 114

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 CDRL2

<400> 114

Gln Val Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 CDRL3

<400> 115

Ala Gln Ala Thr Tyr Ala Pro His Ser

1 5

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 CDRL1

<400> 116

Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Val Thr Tyr Pro Gly

1 5 10

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 CDRL2

<400> 117

Asn Thr Asn Ser Arg Phe Ser

1 5

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 CDRL3

<400> 118

Ser Val Tyr Ile Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Val

1 5 10

<210> 119

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 CDRL1

<400> 119

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

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 CDRL2

<400> 120

Glu Val Asn Lys Arg Ala Ser

1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> 13C7 CDRL3

<400> 121

Ala Ser Tyr Arg Ser Ser Asn Ser Tyr Val

1 5 10

<210> 122

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 CDRL1

<400> 122

Gln Gly Gly Ser Leu Arg Val Ser Tyr Ala His

1 5 10

<210> 123

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 CDRL2

<400> 123

Asp Asp Asp Ser Arg Pro Ser

1 5

<210> 124

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 CDRL3

<400> 124

Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Asp Asn Trp Val

1 5 10

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C4 CDRL1

<400> 125

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

1 5 10 15

<210> 126

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C4 CDRL3

<400> 126

Ala Gln Ala Pro Tyr Trp Thr

1 5

<210> 127

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C7 CDRL1

<400> 127

Gly Leu Asn Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser Asn Tyr Pro Asp

1 5 10

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C7 CDRL2

<400> 128

Asn Thr Asn Ser Arg His Ser

1 5

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C7 CDRL3

<400>

> 129

Ala Leu Tyr Met Gly Ser Asp Ser Val Val

1 5 10

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14G4 CDRL3

<400> 130

Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D7 CDRL1

<400> 131

Gln Gly Gly Thr Leu Gly Arg Tyr Tyr Gly Ser

1 5 10

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> 12D7 CDRL2

<400> 132

Gly Asp Asn Ser Arg Pro Ser

1 5

<210> 133

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D7 CDRL3

<400> 133

Glu Ser Phe Asp Phe Ser Gly Asn Ala Ala Val

1 5 10

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12G8 CDRL1

<400> 134

Gln Gly Gly Asn Phe Gly Asn Phe Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 135

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12G8 CDRL2

<400> 135

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12G8 CDRL3

<400> 136

Gln Ser Gly Ser Ser Ser Asp Asn Val Val

1 5 10

<210> 137

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 VH

<400> 137

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Ile Thr Thr Arg

20 25 30

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

35 40 45

Trp Met Gly Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Val Arg Leu Ile Glu Ala Pro Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 138

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 VH

<400> 138

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Val Ile Ala Gly Tyr Ser Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val			
100	105	110	
Ser Ser			

<210> 139
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 6A6 VH
<400
> 139

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Lys Tyr Tyr Cys			

85 90 95

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

<210> 140

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 VH

<400

> 140

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ile Gln Gly Tyr Gly Thr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 141

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 11H1 VH

<400

> 141

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

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 142
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 5A4 VH

<400

> 142

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Ala Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Val Ala Gln Gly Tyr Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val			
100	105	110	
Ser Ser			

<210> 143
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 VH

<400

> 143

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

Leu Arg Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe			
65	70	75	80
Ser Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg Val Leu Leu Arg Asp Pro Leu Ser Leu Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 144

<211> 114

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8A4 VH

<400> 144

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Glu Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ser Gln Gly Tyr Ile Phe Trp Gly Gln Gly Ala Gln Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 145

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 VH

<400> 145

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

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

<210> 146
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 8H4 VH			
<400> 146			
Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Ser Met Arg Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Thr Ser Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Asp Ser Val			

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

<210> 147

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 10B6 VH

<400> 147

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Ile Gln Gly Tyr Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 148

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 VH

<400> 148

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gly Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Met Gln Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 149

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C3 VH

<400> 149

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Ile Gln Gly Tyr Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 150

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12C12

<400> 150

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Trp Val Gly Ala Ile Val Tyr Asp Gly Ser Thr Phe Tyr Ser Pro Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Leu Gly Leu Tyr Asp Leu Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 151

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12G8 VL

<400> 151

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln

1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Asn Phe Gly Asn Phe Tyr Ala

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Ser Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Asp Asn Val

85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 152

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 VH

<400> 152

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Asn Met Arg Trp Val Arg Gln Val Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu His

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser

<210> 153

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 VH

<400

> 153

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Asn Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala His Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Thr Gly Glu Val Asp Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100 105 110

Ser

<210> 154

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 VH

<400> 154

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr

20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ser Ser Ile Tyr Lys Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Ala Leu Arg Ala Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 155		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<		
220><223> 13G7 VH		
<400> 155		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Thr		
20	25	30
Ala Pro Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Asp		
35	40	45
Trp Met Ala Val Ile Ala Phe Asp Gly Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Ser		
50	55	60
Leu Lys Ser Arg Thr Leu Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe		
65	70	75
Ser Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
85	90	95
Cys Ala Arg Leu Gly Gly Arg Asn Tyr Pro Pro Tyr Val Glu Leu Trp		

100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 156
 <211> 114
 <212>
 > PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 14C4 VH
 <400> 156
 Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Asn Ser Asp Gly Asp Gly Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val

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

 <210> 157
 <211> 117

 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 14C7 VH
 <400> 157
 Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Thr Asn			
20	25	30	
Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	
Trp Met Gly Ala Ile Asp Tyr Ser Gly Asp Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser			
50	55	60	
Leu Lys Ser Arg Thr Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe			
65	70	75	80
Thr Leu Gln Leu Thr Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Val Ser Arg Ile Pro Thr Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln			
100	105	110	
Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210			
> 158			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 14G4 VH			
<400> 158			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr			
20	25	30	
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu			
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Pro Asp Gly Gly Lys Thr Ile Asp Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Ala Phe Ala Ser Ser Arg Asp Asn Thr Met Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Asp Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys			

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 159

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D7 VH

<400> 159

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 160

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12G8 VH

<400> 160

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Asp Met Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys His Arg Pro Gly Ala Leu Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 161

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A11 VL

<400> 161

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Thr Arg

20 25 30

Ser Tyr Pro Gly Trp Phe Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ser

35 40 45

Leu Ile His Ser Thr Ser Ser Arg His Ser Gly Ile Pro Thr Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65	70	75	80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Asp Ile Gly Ser			
85	90	95	
Tyr Ile Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu			
100	105		

<210>

162

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5E5 VL

<400> 162

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Phe Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Gln Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50	55	60	
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly			
85	90	95	
Thr Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 163

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6A6 VL

<400> 163

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

1	5	10	15
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Leu Ile His Thr			
20	25	30	
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Arg			
35	40	45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Ser His Glu Ser Gly Val Pro			
50	55	60	

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala			
85	90	95	
Thr Tyr Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 164

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F4 VL

<400> 164

Asp Leu Val Leu Thr Gln Ile Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

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

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Gly Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala			
85	90	95	
Thr Tyr Tyr Gly His Ser Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			

100	105	110	
<210> 165			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 11H1 VL			
<400> 165			
Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Thr Ile Val Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ile His Ser			
20	25	30	
Ala Gly Lys Thr Tyr Phe Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Arg			
35	40	45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly			
85	90	95	
Thr Tyr Asn Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 166			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 5A4 VL			
<400> 166			
Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ile Gln Ser Leu Val His Thr			
20	25	30	
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly

85 90 95

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

<210> 167

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5A7 VL

<400> 167

Ser Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Gly Thr Leu Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ala Tyr
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Gly Ser Arg
 85 90 95

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

<210> 168

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8A4 VL

<400> 168

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Arg

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn His Glu Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala

85 90 95

Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 169

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8B4 VL

<400> 169

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Thr Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Glu Ser Gly

20 25 30

Ser Asp Gln Lys Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Gln Glu Ser Gly Ile

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln			
85	90	95	
Ala Tyr Ser Ala Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu			
100	105	110	

Lys

<210> 170			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 8H4 VL			
<400> 170			
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Val Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
20	25	30	
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	

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

<210> 171			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 10B6 VL			

<400> 171

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Ile Val Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

<210> 172

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12A3 VL

<400> 172

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Ser Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly

85	90	95
Thr Tyr Tyr Pro Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys		
100	105	110
<210> 173		
<211> 112		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> 12C3 VL		
<400> 173		

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

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

65	70	75	80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala			
85	90	95	
Thr Tyr Ser Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 174			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 12C12 VL			
<400> 174			

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Phe Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn

20	25	30
Tyr Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Lys Ser Gly Ser Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln		
65	70	75
		80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Trp Asp Asp Ser Leu		
85	90	95
Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu		
100	105	110

<210> 175

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D1 VL

<400> 175

Ser Ala Leu Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val		
1	5	10
Val Pro Gly Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gln Ser Leu		

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

85	90	95
Ala Gln Ala Thr Tyr Tyr Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Ser Arg Leu		
100	105	110
Glu Ile Glu Arg		

115
<210> 176

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12D4 VL

<400> 176

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala

85 90 95

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

100 105 110

<210> 177

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 12E12 VL

<400> 177

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

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Thr Ser Val

20 25 30

Thr Tyr Pro Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr

35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Leu Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Tyr Ile Gly Gly

85 90 95

Gly Ile Tyr Pro Ala Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 178

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13C7 VL

<400> 178

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Tyr Val Ala Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ser Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Ser Ser

85 90 95

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

100 105 110

<210> 179

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 13G7 VL

<400> 179

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ala Leu Ser Val Thr Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ser Tyr

35 40 45

Asp Asp Asp Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ala Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Asp Asn

85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 180

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 14C4 VL

<400> 180

Ala Thr Met Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65	70	75	80
Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala			
85	90	95	
Pro Tyr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	
<210> 181			
<211> 110			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			

<220><223> 14C7 VL			
<400> 181			
Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Asn Ser Gly Ser Val Thr Ser Ser			
20	25	30	
Asn Tyr Pro Asp Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu			
35	40	45	
Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Ser Arg His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe			
50	55	60	

Ser Gly Ser Ile Ser Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala			
65	70	75	80
Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Met Gly Ser			
85	90	95	
Asp Ser Val Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu			
100	105	110	

<210> 182			
<211> 112			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> 14G4 VL			
<400> 182			
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Gly Ser Leu Ser Val Val Pro Gly			

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

65 70 75 80
 Ser Gly Val Lys Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala
 85 90 95
 Thr Tyr Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Leu Glu Val Lys
 100 105 110

<210> 183
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 12D7 VL
 <400> 183

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Thr Leu Gly Arg Tyr Tyr Gly
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Asp Asn Ser Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Ser Phe Asp Phe Ser Gly Asn Ala
 85 90 95
 Ala Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu

100

105