

ANTICUERPOS ANTI-APOC3 Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. núm. 62/579,449, presentada el 31 de octubre de 2017, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

CAMPO

La presente descripción se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) y a métodos para usarlos.

ANTECEDENTES

Los niveles elevados de triglicéridos en sangre (hipertrigliceridemia) son un factor causal de aterosclerosis, y aumentan el riesgo de eventos cardiovasculares, tales como muerte cardiovascular, angina, infarto de miocardio, y accidente cerebrovascular.

ApoC3 es una proteína que circula a concentraciones muy altas (más de 10 μ M) en la sangre, unida principalmente a lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL), restos de TRL, y lipoproteínas de alta densidad. ApoC3 parece ser una importante reguladora de los niveles de triglicéridos en la sangre. Por ejemplo, se demostró que los niveles de ApoC3 en humanos se correlacionan positivamente con los niveles de triglicéridos en sangre, con niveles elevados de ApoC3 asociados con hipertrigliceridemia. En adición, se demostró que ApoC3 inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa (una enzima que hidroliza los triglicéridos en TRL) y también inhibe la absorción hepática de los restos de TRL, los cuales causan la elevación de los niveles de triglicéridos en sangre.

Se aprobaron varias terapias para el tratamiento de la hipertrigliceridemia, tales como los fibratos, niacina, y ácidos grasos omega-3. Sin embargo estas terapias son solo modestamente efectivas para reducir los triglicéridos en plasma. En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de terapias mejoradas para reducir los triglicéridos en plasma.

SUMARIO

La presente descripción proporciona anticuerpos que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) e inhiben la función de ApoC3. Se proporcionan, además, composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para producir

estos anticuerpos, y métodos para tratar a un sujeto mediante el uso de estos anticuerpos.

En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción pueden atenuar la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción de TRL en los hepatocitos y pueden causar una disminución rápida y sostenida en los niveles en suero de ApoC3 y ApoB cuando se administran a un sujeto. En consecuencia, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos son útiles para el tratamiento y prevención de la hipertrigliceridemia y enfermedades asociadas (por ejemplo, enfermedad cardiovascular y pancreatitis).

En consecuencia, en un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 con una primera constante de disociación (K_D) a pH 7.4 y con una segunda K_D a pH 5.5, en donde la relación entre la segunda K_D y la primera K_D es al menos aproximadamente 5, 10, 20, o 50. En ciertas modalidades, la primera K_D es menor que 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, o 0.1 nM. En ciertas modalidades, la vida media del anticuerpo en un ratón que expresa ApoC3 es al menos aproximadamente 3, 7, 14, 21, o 28 días.

En ciertas modalidades, el anticuerpo atenúa la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción en los hepatocitos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de aumentar la velocidad de eliminación de ApoC3 de la sangre en un sujeto. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de aumentar la velocidad de eliminación de ApoB de la sangre en un sujeto. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de reducir el nivel de ApoC3 en la sangre de un sujeto. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de reducir el nivel de ApoC3 en la sangre en un sujeto en al menos un 40 % por al menos 2 semanas. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de reducir el nivel de ApoB en la sangre de un sujeto. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de reducir el nivel de ApoB en la sangre de un sujeto en al menos un 20 % por al menos 2 semanas. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la lipemia posprandial en un sujeto. En ciertas modalidades, el anticuerpo es capaz de unirse a ApoC3 unida a lípidos.

En ciertas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende al menos uno de los aminoácidos en la posición 2, 5, 6, 8, o 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 5 y 6 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 2, 5, 6, y 8 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades,

el epítipo comprende los aminoácidos en la posición 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 6, 8, y 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 6 y 8 de la SEQ ID NO: 2.

En ciertas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo humanizado) comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTX₁X₂GGTAYRDSVKG, en donde X₁ es G, E, o D, y X₂ es G o A (SEQ ID NO: 87);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);
- (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, en donde X es D o G (SEQ ID NO: 88);
- (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
- (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AXGTYYPHT, en donde X es Q o H (SEQ ID NO: 8), y opcionalmente en donde las CDRH1, CDRH2, y CDRH3 del anticuerpo no son SEQ ID NO: 3, 9 10; 3, 11, 10; 3, 9, 12; o 3, 11, 12, respectivamente. En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), o SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39). En ciertas modalidades, CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) o KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40). En ciertas modalidades, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) o AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

En ciertas modalidades, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 36, 10, 6, 7, y 14; 3, 37, 10, 40, 7, y 14; 3, 38, 10, 40, 7, y 14; 3, 38, 10, 6, 7, y 14; 3, 39, 10, 6, 7, y 14; o 3, 37, 10, 40, 7, y 13, respectivamente. En ciertas modalidades, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42-53. En ciertas modalidades, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 54-65. En ciertas modalidades, la región variable de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, comprenden las

secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 42 y 54, 43 y 55, 44 y 56, 45 y 57, 46 y 58, 46 y 54, 47 y 58, 47 y 54, 48 y 58, 48 y 54, 49 y 59, 49 y 60, 50 y 59, 50 y 60, 51 y 61, 52 y 62, 53 y 62, 43 y 63, 44 y 64, o 45 y 65.

En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
 - (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIX₁TDGGGTAYRDSVKG, en donde X₁ es S o H (SEQ ID NO: 4);
 - (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de X₂GYSD, en donde X₂ es A o H (SEQ ID NO: 5);
 - (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);
 - (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
 - (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AX₃GTYYPHT, en donde X₃ es Q o H (SEQ ID NO: 8),
- y en donde al menos uno de X₁, X₂, y X₃ es H .

En ciertas modalidades, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 11, 10, 6, 7, y 13; 3, 9, 12, 6, 7, y 13; 3, 9, 10, 6, 7, y 14; 3, 11, 10, 6, 7, y 14; 3, 9, 12, 6, 7, y 14; 3, 11, 12, 6, 7, y 13; o 3, 11, 12, 6, 7, y 13, respectivamente. En ciertas modalidades, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16-18. En ciertas modalidades, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 20. En ciertas modalidades, la región variable de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 16 y 19, 17 y 19, 18 y 19, 15 y 20, 16 y 20, 17 y 20, o 18 y 20, respectivamente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTX₁X₂GGTAYRDSVKG, en donde X₁ es G, E, o D, y X₂ es G o A (SEQ ID NO: 87);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);
- (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, en donde X es D o G (SEQ ID NO: 88);
- (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
- (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AXGTYYPHT, en donde X es Q o H (SEQ ID NO: 8).

En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), o SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39). En ciertas modalidades, CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) o KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40). En ciertas modalidades, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) o AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13). En ciertas modalidades, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 36, 10, 6, 7, y 14; 3, 37, 10, 40, 7, y 14; 3, 38, 10, 40, 7, y 14; 3, 38, 10, 6, 7, y 14; 3, 39, 10, 6, 7, y 14; o 3, 37, 10, 40, 7, y 13, respectivamente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 42- 53.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 54-65.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 42 y 54, 43 y 55, 44 y 56, 45 y 57, 46 y 58, 46 y 54, 47 y 58, 47 y 54, 48 y 58, 48

y 54, 49 y 59, 49 y 60, 50 y 59, 50 y 60, 51 y 61, 52 y 62, 53 y 62, 43 y 63, 44 y 64, o 45 y 65.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3, que comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
 - (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIX₁TDGGGTAYRDSVKG, en donde X₁ es S o H (SEQ ID NO: 4);
 - (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de X₂GYSD, en donde X₂ es A o H (SEQ ID NO: 5);
 - (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);
 - (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
 - (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AX₃GTYYPH, en donde X₃ es Q o H (SEQ ID NO: 8),
- y en donde al menos uno de X₁, X₂, y X₃ es H.

En ciertas modalidades, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 11, 10, 6, 7, y 13; 3, 9, 12, 6, 7, y 13; 3, 9, 10, 6, 7, y 14; 3, 11, 10, 6, 7, y 14; 3, 9, 12, 6, 7, y 14; 3, 11, 12, 6, 7, y 13; o 3, 11, 12, 6, 7, y 13, respectivamente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16-18.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 16 y 19, 17 y 19, 18 y 19, 15 y 20, 16 y 20, 17 y 20, o 18 y 20, respectivamente.

En ciertas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo comprende, además, una región constante humana o humanizada. En ciertas modalidades, la región constante es una variante de una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana de tipo salvaje y en donde la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana de la variante tiene una afinidad aumentada por el receptor Fc neonatal humano (FcRn) a pH 6 en relación con la afinidad de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina humana de tipo salvaje para el FcRn humano a pH 6. En ciertas modalidades, la región constante es una región constante de la cadena pesada de una IgG humana. En ciertas modalidades, la región constante es una región constante de la cadena pesada de una IgG₁, IgG₂, o IgG₄ humana.

En ciertas modalidades, la región constante comprende los aminoácidos K, F, y Y en las posiciones de EU 433, 434, y 436, respectivamente. En ciertas modalidades, la región constante comprende los aminoácidos Y, T, y E en las posiciones de EU 252, 254, y 256, respectivamente. En ciertas modalidades, la región constante comprende los aminoácidos L y S en las posiciones de EU 428 y 434, respectivamente. En ciertas modalidades, la región constante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 22-24, 76-78, y 81-86.

En ciertas modalidades, el anticuerpo aislado comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 66-73. En ciertas modalidades, el anticuerpo aislado comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 74. En ciertas modalidades, el anticuerpo aislado comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 66 y 74, 67 y 74, 68 y 74, 69 y 74, 70 y 74, 71 y 74, 72 y 74, o 73 y 74, respectivamente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según se describe en la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión como se describe en la presente

descripción.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a ApoC3, el método comprende el cultivo de la célula huésped como se describe en la presente descripción en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir la actividad de ApoC3 en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para reducir los niveles de triglicéridos en la sangre de un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para inhibir la lipemia posprandial en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar la hipertrigliceridemia en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción. En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar la quilomicronemia en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular en un sujeto con hipertrigliceridemia, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción. En ciertas modalidades, la enfermedad cardiovascular es infarto de miocardio. En ciertas modalidades, la enfermedad cardiovascular es angina. En ciertas modalidades, la enfermedad cardiovascular es accidente cerebrovascular. En ciertas modalidades, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis.

En ciertas modalidades de los aspectos anteriores en relación con los métodos de tratamiento, el anticuerpo reduce los niveles de quilomacrón o restos de quilomacrón en la sangre del sujeto. En ciertas modalidades, el sujeto recibe un agente hipolipemiante adicional. En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante adicional es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas modalidades, el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o

simvastatina. En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante adicional es un inhibidor de PCSK9. En ciertas modalidades, el inhibidor de PCSK9 es alirocumab, evolocumab, o bococizumab. En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante adicional es ezetimiba. En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante adicional es una combinación de ezetimiba y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante adicional es una combinación de ezetimiba, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, y un inhibidor de PCSK9.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A, 1B, y 1C son una serie de gráficos que muestran que los anticuerpos 5E5WT (Figura 1A), 5E5VH5_VL8 (Figura 1B), y 5E5VHWT_VL8 (“VL8”), 5E5VH12_VLWT (“VH12”), 5E5VH5_VLWT (“VH5”), y 5E5VH5_VL8 (“VH5_VL8”) (Figura 1C) atenuaron la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) por células HepG2. Las células HepG2 se incubaron con Dil VLDL y ApoC3 purificado solo o en presencia de un anticuerpo anti-ApoC3 como se indica. Las Dil VLDL ingeridas por células HepG2 se midieron por espectroscopía de fluorescencia del colorante Dil. Las células HepG2 incubadas con Dil VLDL solo (“VLDL”) sirvieron como control positivo, y las células HepG2 incubadas con Dil VLDL y ApoC3 purificada en ausencia de un anticuerpo anti-ApoC3 (“ApoC3”) sirvieron como control negativo.

La Figura 2A es un gráfico que muestra los niveles en suero a diversos tiempos posinyección de dos anticuerpos anti-ApoC3, 5E5 y 5E5VH5_VL8, y un anticuerpo IgG₁ humano antilisosoma de huevo de gallina (HyHEL5), en un modelo de ratón de ApoC3 AAV8-humana.

La Figura 2B es un gráfico que muestra el efecto de 5E5 y 5E5VH5_VL8 sobre el nivel de ApoC3 humana circulante en un modelo de ratón de ApoC3 AAV8-humana.

La Figura 2C es un gráfico que muestra el efecto de 5E5 y 5E5VH5_VL8 sobre el nivel de ApoB circulante en un modelo de ratón de ApoC3 AAV8-humana.

La Figura 3 es una serie de sensorgramas de resonancia de plasmón superficial (SPR) que muestran la cinética de unión de veinte anticuerpos anti-ApoC3 humanizados (mAb1 a mAb20) para ApoC3 humana, cuando ApoC3 humana se inmoviliza en un chip biosensor. Los sensorgramas con líneas punteadas y continuas corresponden a los pH de ensayo de 7.4 y 5.5, respectivamente. Como referencia, los sensorgramas correspondientes a 5E5VH5_VL8 a una concentración de 25 nM se incluyen en cada gráfico (en línea discontinua a pH 7.4 y en línea discontinua larga a pH 5.5).

La Figura 4 es una serie de sensorgramas de SPR que muestran la cinética de unión de veinte anticuerpos anti-ApoC3 humanizados (mAb1 a mAb20) para ApoC3 humana, cuando los anticuerpos para ApoC3 se inmovilizan en un chip biosensor. Los sensorgramas en línea punteada y continua corresponden a los pH del ensayo de 7.4 y 5.5, respectivamente. Como referencia, los sensorgramas correspondientes a 5E5VH5_VL8 a una concentración de nhuApoC3 objetivo de 600 nM se incluyen en cada gráfico (línea discontinua a pH 7.4 y líneas discontinuas largas a pH 5.5).

Las Figuras 5A-C son gráficos que muestran el porcentaje de actividad de anticuerpos humanizados seleccionados y 5E5VH5_VL8 después de la incubación de los anticuerpos a las temperaturas indicadas por 1 hora, en relación con la actividad de los anticuerpos correspondientes incubados a 4 °C por 1 hora. La actividad se midió como la velocidad de asociación en la Figura 5A, y se midió como el valor máximo de RU (R0) en las Figuras 5B y 5C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción proporciona anticuerpos que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) e inhiben la función de ApoC3. Se proporcionan, además, composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para producir estos anticuerpos, y métodos para tratar a un sujeto mediante el uso de estos anticuerpos. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción pueden atenuar la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción de TRL en los hepatocitos y pueden causar una disminución rápida y sostenida en los niveles en suero de ApoC3 y ApoB cuando se administran a un sujeto. En consecuencia, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos son útiles para el tratamiento y prevención de la hipertrigliceridemia y enfermedades asociadas (por ejemplo, enfermedad cardiovascular y pancreatitis).

1. Definiciones

Como se usa en la presente descripción, el término “ApoC3” se refiere a la proteína Apolipoproteína C3. En ciertas modalidades, la ApoC3 es ApoC3 humana. Una secuencia de aminoácidos de ApoC3 humana ejemplar se establece en el número de acceso RefSeq NP_000031.1. La secuencia de aminoácidos madura de NP_000031.1 es la siguiente:

SEAEDASLLSFMQGYMKHATKTAKDALSSVQESQVAQQARGWVTDGFSSLKDYWS
TVKDKFSEFWDLDPVRPTSAVAA (SEQ ID NO: 1).

Como se usa en la presente descripción, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos de longitud completa, y moléculas que comprenden CDR, regiones VH o regiones VL de anticuerpos. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, inmunoglobulinas, anticuerpos sintéticos, anticuerpos tetaméricos que comprenden dos moléculas de cadena pesada y dos de cadena ligera, un monómero de cadena ligera de anticuerpo, un monómero de cadena pesada de anticuerpo, un dímero de cadena ligera de anticuerpo, un dímero de cadena pesada de anticuerpo, un par cadena pesada de anticuerpo- cadena ligera de anticuerpo, intracuerpos, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de dominio simple, anticuerpos monovalentes, anticuerpos de cadena simple o Fvs de cadena simple (scFv), scFv-Fcs, anticuerpos de camélidos (por ejemplo, anticuerpos de llama), anticuerpos camelizados, afficuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs ligados por disulfuro (sdFv), anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluidos, por ejemplo, anticuerpos anti-anti-Id), y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción se refieren a poblaciones de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), cualquier clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂), o cualquier subclase (por ejemplo, IgG_{2a} o IgG_{2b}) de la molécula de inmunoglobulina. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción son anticuerpos de IgG, o una clase (por ejemplo, IgG₁ o IgG₄ humanos) o subclase de estos. En una modalidad específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado.

Como se usa en la presente descripción, el término “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que se identificó y se separó y/o recuperó a partir de al menos un componente de su entorno natural. El término “anticuerpo aislado” incluye un anticuerpo *in situ* dentro de una célula huésped recombinante.

Como se usa en la presente descripción, el término “CDR” o “región determinante de complementariedad” significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares se describieron por Kabat y otros, J. Biol. Chem 252, 6609-6616 (1977) y Kabat y otros, Sequences of protein of immunological interest. (1991), por Chothia y otros, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), y por MacCallum y otros, J. Mol. Biol.

262:732-745 (1996), todos los cuales se incorporan en su totalidad como referencia, donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos aminoacídicos cuando se comparan entre sí. En ciertas modalidades, el término “CDR” es un CDR como se define por Kabat y otros, J. Biol. Chem 252, 6609-6616 (1977) y Kabat y otros, Sequences of protein of immunological interest. (1991). CDRH1, CDRH2 y CDRH3 denotan las CDR de cadena pesada, y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 denotan las CDR de cadena ligera.

Como se usa en la presente descripción, el término “residuos aminoacídicos del marco (FR)” se refiere a aquellos aminoácidos en la región marco de una cadena de inmunoglobulina. El término “región marco” o “región FR” como se usa en la presente descripción, incluye los residuos aminoacídicos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (por ejemplo, mediante el uso de la definición de CDR de Kabat).

Como se usa en la presente descripción, los términos “región variable” y “dominio variable” se usan indistintamente y son comunes en la técnica. La región variable típicamente se refiere a una porción de un anticuerpo, generalmente, una porción de una cadena ligera o pesada, típicamente alrededor de los aminoácidos del 110 a 120 o de los aminoácidos del 110 al 125 aminoterminal en la cadena pesada madura y de aproximadamente de los aminoácidos 90 al 115 en la cadena ligera madura, que difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en aquellas regiones llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se llaman regiones marco (FR). Sin desear limitarse a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que las CDR de las cadenas ligeras y pesadas son las principales responsables de la interacción y la especificidad del anticuerpo con el antígeno. En ciertas modalidades, la región variable es una región variable humana. En ciertas modalidades, la región variable comprende CDR murinas o de roedores y las regiones marco humanas (FR). En modalidades particulares, la región variable es una región variable de primates (por ejemplo, primates no humanos). En ciertas modalidades, la región variable comprende CDR murinas o de roedores y regiones marco (FR) de primates (por ejemplo, primates no humanos).

Los términos “VL” y “dominio VL” se usan indistintamente para referirse a la región variable de cadena ligera de un anticuerpo.

Los términos “VH” y “dominio VH” se usan indistintamente para referirse a la región

variable de cadena pesada de un anticuerpo.

Como se usa en la presente descripción, los términos “región constante” y “dominio constante” son intercambiables y son comunes en la técnica. La región constante es una porción de anticuerpo, por ejemplo, una porción carboxilo terminal de una cadena ligera o pesada que no participa directamente en la unión de un anticuerpo al antígeno pero que puede exhibir diversas funciones efectoras, tal como la interacción con el receptor de Fc. La región constante de una molécula de inmunoglobulina generalmente tiene una secuencia de aminoácidos más conservada en relación con un dominio variable de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente descripción, el término “cadena pesada” cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ), y mu (μ), basado en la secuencia de aminoácidos del dominio constante, que da lugar a las clases de anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, respectivamente, incluidas las subclases de IgG, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Como se usa en la presente descripción, el término “cadena ligera” cuando se usa en referencia a un anticuerpo puede referirse a cualquier tipo distinto, por ejemplo, kappa (κ) o lambda (λ) basado en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera se conocen bien en la técnica. En modalidades específicas, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

Como se usa en la presente descripción, el término “posición de EU” se refiere a la posición de aminoácidos según la convención de numeración de EU para las regiones constantes de un anticuerpo, como se describe en Edelman, GM y otros, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) y Kabat y otros, en “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health and Human Services, 5ª edición, 1991, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

Como se usa en la presente descripción, el término “se une específicamente a” se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 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, o menos, o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno inespecífico.

Como se usa en la presente descripción, un “epítipo” se refiere a una región localizada de un antígeno al que puede unirse específicamente un anticuerpo. Un epítipo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (un epítipo lineal o contiguo)

o un epítopo, por ejemplo, puede formarse a partir de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o polipéptidos (un epítopo conformacional, no lineal, discontinuo, o no contiguo). En ciertas modalidades, el epítopo al que se une un anticuerpo puede determinarse mediante, por ejemplo, espectroscopía de NMR, estudios de cristalografía de difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas con electropulverización y cromatografía líquida), ensayos de barrido de péptidos, o mapeo por mutagénesis (por ejemplo, mapeo por mutagénesis dirigida al sitio).

Como se usa en la presente descripción, el término “tratar”, “que se trata,” y “tratamiento” se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente descripción. Los métodos de “tratamiento” emplean la administración de un anticuerpo anti-ApoC3 a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, o predispuesto a tener tal una enfermedad o trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, reducir el riesgo de desarrollar, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

Como se usa en la presente descripción, el término “cantidad efectiva” en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a la cantidad de una terapia que logra un efecto profiláctico o terapéutico deseado.

Como se usa en la presente descripción, el término “sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano.

Como se usa en la presente descripción, el término “o” significa y/o.

Como se usa en la presente descripción, los términos “alrededor de” y “aproximadamente”, cuando se usan para modificar un valor numérico o intervalo numérico, indican que las desviaciones de 5 % a 10 % por encima y de 5 % a 10 % por debajo del valor o intervalo permanecen dentro del significado previsto del valor o intervalo informado.

2. Anticuerpos anti-ApoC3

La presente descripción proporciona anticuerpos aislados (por ejemplo, anticuerpos humanizados) que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) e inhiben la función de ApoC3.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados se unen a la proteína ApoC3 de un mamífero. En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados se unen a ApoC3 humana. En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados se unen a ApoC3 de *Macaca fascicularis* (mono cynomolgus).

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados se unen a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) con una mayor afinidad a pH fisiológico (por ejemplo, pH 7.4) que a pH ácido (por ejemplo, de pH 5.5 a pH 6). Los métodos para generar tales anticuerpos dependientes del pH se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, en un método ejemplar, uno o más residuos amino en las CDR de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-ApoC3 se sustituyen con un residuo de histidina, como se describe en: Igawa y otros, Nat Biotechnol. (2010) 28(11):1203-1207; Chaparro-Riggers y otros, J Biol Chem. (2012) 287(14):11090-11097; patente de EE. UU. número 9,096,651, y publicación de patente de EE. UU. número US20110111406A1, cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia. Sin embargo, aunque tales métodos se conocen bien en la técnica, el trabajador experto apreciará que, para cualquier anticuerpo dado, los aminoácidos de las CDR precisos que pueden mutarse a histidina para lograr la unión dependiente del pH al antígeno sin alterar la afinidad del anticuerpo por el antígeno solo pueden determinarse empíricamente (ver, por ejemplo, Edgcomb y Murphy, Proteins (2002) 49:1-6, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia).

Un experto en la técnica apreciaría que la afinidad de un anticuerpo a un antígeno puede indicarse mediante la constante de disociación (K_D), en donde una K_D más pequeña indica una afinidad más alta. En consecuencia, en ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 se unen a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) con una primera K_D a pH 7.4 y con una segunda K_D a pH 5.5, en donde la relación entre la segunda K_D y la primera K_D es al menos 1 (por ejemplo, al menos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100).

En ciertas modalidades, la primera K_D es menor que 100 nM (por ejemplo, menor que 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, o 0.1 nM). En ciertas modalidades, la segunda K_D es mayor que 1 nM (por ejemplo, mayor que 2, 5, 10, 20, o 50 nM, o mayor que 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, o 100 μ M). En ciertas modalidades, la primera K_D es menor que 100 nM (por ejemplo, menor que 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2, o 0.1 nM), y la vida media del anticuerpo en un animal (por ejemplo, un humano o un ratón) que expresa ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) es al menos aproximadamente 1 día (por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 6, u 8 semanas). En ciertas modalidades, la ApoC3 es ApoC3 humana, y el animal que expresa la ApoC3 es un humano. En ciertas modalidades, la ApoC3 es ApoC3 humana, y el animal que expresa la ApoC3 es un ratón que expresa ApoC3 humana.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción atenúan la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción en los hepatocitos de TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL (*in vivo* o *in vitro*). En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción atenúan la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción en los hepatocitos de TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL por al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción atenúan la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción en los hepatocitos de TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL por al menos aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción son capaces de inhibir la lipemia posprandial en un sujeto cuando se administra al sujeto antes, durante, o después de una comida. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son capaces de inhibir la lipemia posprandial en el sujeto en al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son capaces de inhibir la lipemia posprandial en el sujeto en al menos aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción son capaces de reducir los niveles de quilomicrón o restos de quilomicrón posprandiales en un sujeto cuando se administran al sujeto antes, durante, o después de una comida. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son capaces de reducir los niveles de quilomicrón o restos de quilomicrón posprandiales

en un sujeto en al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son capaces de reducir los niveles de quilomicron o restos de quilomicron posprandiales en un sujeto en al menos aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción son capaces de aumentar las tasas de eliminación de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) de la sangre en un sujeto. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 son capaces de aumentar las tasas de eliminación de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) de la sangre en un sujeto en al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son capaces de aumentar las tasas de eliminación de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) de la sangre en un sujeto en al menos aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. Los métodos para evaluar la eliminación de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) incluyen sin limitación las técnicas de trazadores de isótopos, en donde el isótopo puede ser radioactivo o estable.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción son capaces de reducir los niveles de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 son capaces de reducir los niveles de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto en al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica.

35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son capaces de reducir los niveles de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto en al menos aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, la reducción en los niveles de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre en el sujeto se mantiene durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 semanas.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción son capaces de unirse a ApoC3 unida a lípidos (por ejemplo, ApoC3 unida a triglicéridos, TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL). En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción no inhiben la unión de ApoC3 a un lípido o una lipoproteína. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción no compiten por la unión de ApoC3 con un lípido o una lipoproteína. En ciertas modalidades, el lípido comprende una cadena de ácido graso. En ciertas modalidades, el lípido comprende un grupo fosfatidilo. En ciertas modalidades, el lípido comprende una fosfatidilcolina (por ejemplo, DMPC), una fosfatidilserina, una fosfatidiletanolamina, un fosfatidilinositol o un fosfatidilglicerol. En ciertas modalidades, el lípido es un triglicérido. En ciertas modalidades, la lipoproteína es una TRL (por ejemplo, VLDL) o un resto de TRL. En ciertas modalidades, la capacidad de ApoC3 para unirse a lípidos y lipoproteínas (por ejemplo, triglicéridos, TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL) en presencia de un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción es de al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de la capacidad de ApoC3 para unirse a los mismos lípidos y lipoproteínas en ausencia de un anticuerpo anti-ApoC3, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción atenúan la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción en los hepatocitos de TRL (por

ejemplo, VLDL) o restos de TRL. En ciertas modalidades, la absorción de TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL en los hepatocitos (por ejemplo, células HepG2) en presencia de un anticuerpo anti-ApoC3 como se describe en la presente descripción es al menos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, o 5 veces más que la absorción de TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL en los hepatocitos (por ejemplo, células HepG2) en ausencia de un anticuerpo anti-ApoC3.

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción atenúan la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción de TRL en los hepatocitos (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL, y son capaces de unirse a ApoC3 unida a lípidos (por ejemplo, ApoC3 unida a triglicéridos, TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL).

En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción se unen a un epítipo de ApoC3 dentro de la secuencia de aminoácidos FSEFWDLDP (SEQ ID NO: 2). En ciertas modalidades, el epítipo comprende al menos un aminoácido dentro de la SEQ ID NO: 2, y opcionalmente comprende uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 contiguo a la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende al menos uno de los aminoácidos en la posición 2, 5, 6, 8, o 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende al menos dos de los aminoácidos en la posición 2, 5, 6, 8, o 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende al menos tres de los aminoácidos en la posición 2, 5, 6, 8, o 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende al menos cuatro de los aminoácidos en la posición 2, 5, 6, 8, o 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 5 y 6 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 2, 5 y 6 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 2, 5 y 8 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 2, 5, 6, y 8 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende el aminoácido en la posición 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 6 y 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 8 y 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 6 y 8 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, el epítipo comprende los aminoácidos en las posiciones 6, 8 y 10 de la SEQ ID NO: 2. En ciertas modalidades, los anticuerpos son capaces de unirse a ApoC3 unida a lípidos (por ejemplo, ApoC3 unido a triglicéridos, TRL (por ejemplo, VLDL) o restos de TRL). En ciertas modalidades, los anticuerpos no son capaces de

atenuar la capacidad de ApoC3 para inhibir la lipólisis mediada por lipoproteína lipasa de TRL (por ejemplo, VLDL). En ciertas modalidades, los anticuerpos atenúan, además, la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción en los hepatocitos de TRL (por ejemplo, VLDL) o restos TRL. En ciertas modalidades, los anticuerpos son capaces, además, de inhibir la lipemia posprandial en un sujeto cuando se administra al sujeto antes, durante, o después de una comida. En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción son capaces, además, de reducir los niveles de quilomacrón o restos de quilomacrón posprandiales en un sujeto cuando se administra al sujeto antes, durante, o después de una comida.

Puede usarse cualquier ensayo adecuado para medir las actividades funcionales anteriores de los anticuerpos descritos en la presente descripción. Los ensayos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los ensayos funcionales descritos en los ejemplos de la presente descripción.

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares se exponen en las Tablas 1-13, en la presente descripción.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de la CDR de cadena pesada de anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares.

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

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la CDR de cadena ligera de anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares.

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

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de la VH de anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares.

Clon de VH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
5E5VHWT	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	15
5E5VH5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	16
5E5VH12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSS	17
5E5VH5VH 12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSS	18

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de la VL de anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares.

Clon de VL	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
5E5VLWT	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVK AEDAGVYYCAQGTYYPHTFGSGTRLEIK	19
5E5VL8	ATMLTQSPGSLSVVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVK AEDAGVYYCAHGTYYPHTFGSGTRLEIK	20

Tabla 5. Secuencias de VH y VL de anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares.

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

Tabla 6. Secuencias de regiones constantes de la cadena pesada y cadena ligera ejemplares.

Región constante	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Región constante de IgG ₁ humana de tipo salvaje	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	21
Región constante de IgG ₁ humana de tipo salvaje	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	75

Región constante	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Región constante de IgG ₁ humana YTE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	22
Región constante de IgG ₁ humana YTE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTL <u>YITRE</u> PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	76
Región constante de IgG ₁ humana HNance	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPGK	23
Región constante de IgG ₁ humana HNance	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEAL <u>KF</u> HYTQKSLSLSPG	77

Región constante	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Región constante de IgG ₁ humana Xtend	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYHTQKSLSLSPGK	24
Región constante de IgG ₁ humana Xtend	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYHTQKSLSLSPG	78
Región constante de IgG ₄ humana de tipo salvaje	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	79
Región constante S228P de IgG ₄ humana de tipo salvaje	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	80

Región constante	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Región constante S228P de IgG ₄ humana YTE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	81
Región constante S228P de IgG ₄ humana YTE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	82
Región constante S228P de IgG ₄ humana HNance	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALKFHYTQKSLSLGLG	83
Región constante S228P de IgG ₄ humana HNance	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALKFHYTQKSLSLGLG	84

Región constante	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
Región constante S228P de IgG ₄ humana Xtend	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVLHEALHSHYHTQKSLSLSLGK	85
Región constante S228P de IgG ₄ humana Xtend	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVLHEALHSHYHTQKSLSLSLG	86
Región constante de Igκ humana	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	25
Región constante de Igλ humana	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	26

Tabla 7. Secuencias completas de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti-ApoC3 ejemplares.

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
5E5VH5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM >NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	27
5E5VH5_YTE	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM >NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL <u>YITREP</u> EVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
5E5VH5_HNance	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM >NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPGK	29
5E5VH5_Xtend	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSIHTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM >NNLKPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSV <u>L</u> HEALH <u>S</u> HYTQKSLSLSPGK	30
5E5VH12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM >NNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE	31

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
	SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
5E5VH12_YTE	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITRE PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
5E5VH12_HNance	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALKFHYTQKSLSLSPGK	33
5E5VH12_Xtend	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVP RKALEWVSSISTDGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQM NNLKPEDTAIYYCVIHGYSDWGQGTQVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	34

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVLHEALHSHYHTQKSLSLSPGK	
5E5VL8_cadena ligera completa	ATMLTQSPGSLSVPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGVK AEDAGVYYCAHGTYYPHTFGSGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	35

Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares se exponen en las Tablas 8-13, en la presente descripción.

Tabla 8. Secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares.

Clon de VH	CDRH1	SEQ ID NO	CDRH2	SEQ ID NO	CDRH3	SEQ ID NO
CDR de VH consenso	TYSMR	3	SIHTX ₁ X ₂ GGTAYRDSVKG, en donde X ₁ es G, E, o D, y X ₂ es G o A	87	AGYSD	10
mAb7_VH	TYSMR	3	SIHTGGGGTAYRDSVKG	36	AGYSD	10
mAb1_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb2_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb3_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb4_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb5_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb6_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb8_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb9_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb10_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10

Clon de VH	CDRH1	SEQ ID NO	CDRH2	SEQ ID NO	CDRH3	SEQ ID NO
mAb11_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb12_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb13_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb14_VH	TYSMR	3	SIHTEGGGTAYRDSVKG	39	AGYSD	10
mAb15_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb16_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb17_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb18_VH	TYSMR	3	SIHTEAGGTAYRDSVKG	37	AGYSD	10
mAb19_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10
mAb20_VH	TYSMR	3	SIHTDAGGTAYRDSVKG	38	AGYSD	10

Tabla 9. Secuencias de aminoácidos de la CDR de cadena ligera de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares.

Clon de VL	CDRL1	SEQ ID NO	CDRL2	SEQ ID NO	CDRL3	SEQ ID NO
CDR de VL consenso	KTSQGLVHSXGKTYF Y, en donde X es D o G	88	QVSNRA S	7	AXGTYYPHT, en donde X es Q o H	8
mAb7_VL	KTSQGLVHSDGKTYF Y	6	QVSNRA S	7	AHGTYYPHT	14
mAb1_VL	KTSQGLVHSDGKTYF Y	6	QVSNRA S	7	AHGTYYPHT	14
mAb2_VL	KTSQGLVHSDGKTYF Y	6	QVSNRA S	7	AHGTYYPHT	14
mAb3_VL	KTSQGLVHSDGKTYF Y	6	QVSNRA S	7	AHGTYYPHT	14
mAb4_VL	KTSQGLVHSDGKTYF Y	6	QVSNRA S	7	AHGTYYPHT	14
mAb5_VL	KTSQGLVHSDGKTYF Y	6	QVSNRA S	7	AHGTYYPHT	14

Clon de VL	CDRL1	SEQ ID NO	CDRL2	SEQ ID NO	CDRL3	SEQ ID NO
mAb6_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb8_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb9_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb10_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb11_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb12_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb13_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb14_VL	KTSQGLVHSDGKTYFY	6	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb15_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
mAb16_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb17_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
mAb18_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14
mAb19_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AQGTYYPHT	13
mAb20_VL	KTSQGLVHSGGKTYFY	40	QVSNRAS	7	AHGTYYPHT	14

Tabla 10. Secuencias de aminoácidos de VH de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares.

Clon de VH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH consens o	QLX ₁ ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFX ₂ TYSMRWVRQX ₃ P GKGLEWVSSIHTX ₄ X ₅ GGTAYRDSVKGRFTISRDNX ₆ KNTLYLQ MNX ₇ LX ₈ X ₉ EDTAX ₁₀ YYCVIAGYSDWGQGTGX ₁₁ VTVSS, en donde X ₁ es V o L; X ₂ es G o S; X ₃ es V o A; X ₄ es G, E, o D; X ₅ es G o A; X ₆ es A o S; X ₇ es S o N; X ₈ es R o K; X ₉ es A o P; X ₁₀ es I o V; y X ₁₁ es L o Q	89
VH consens o	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFX ₁ TYSMRWVRQX ₂ PG KGLEWVSSIHTX ₃ X ₄ GGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NX ₅ LX ₆ X ₇ EDTAX ₈ YYCVIAGYSDWGQGTGX ₉ VTVSS, en donde X ₁ es G o S; X ₂ es V o A; X ₃ es G, E, o D; X ₄ es G o A; X ₅ es S o N; X ₆ es R o K; X ₇ es A o P; X ₈ es I o V; y X ₉ es L o Q	90
mAb1_VH, mAb2_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPGK GLEWVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	46

Clon de VH	Secuencia de aminoácidos	SEQ NO	ID
mAb3_V H, mAb4_V H	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	47	
mAb5_V H, mAb6_V H	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	48	
mAb7_V H	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	42	
mAb8_V H, mAb9_V H	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTDAGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	49	
mAb10_VH, mAb11_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQVPGK GLEWVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	50	
mAb12_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQVPGK GLEWVSSIHTDAGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRPEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	51	
mAb13_VH	QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQVPGK GLEWVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	52	
mAb14_VH	QLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQVPGK GLEWVSSIHTEGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	53	
mAb15_VH, mAb16_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTAGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LKAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTQVTVSS	43	
mAb17_VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGK	44	

Clon de VH	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VH, mAb18_ VH	GLEWVSSIHTTEAGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	
mAb19_ VH, mAb20_ VH	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTDAGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRPEDTAVYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSS	45

Tabla 11. Secuencias de aminoácidos de VL de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares.

Clon de VL	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VL consenso	DIVMTQSPX ₁ SLX ₂ VX ₃ PGESASISCKTSQGLVHSX ₄ GKTYFYW FLQKPGQSPQX ₅ LIYQVSNRASGVPDRFX ₆ GSGSGTDFTLKIS X ₇ V X ₈ AEDX ₉ GVYYCAX ₁₀ GTYYPHTFGX ₁₁ GTRLEIK, en donde X ₁ es L o G; X ₂ es P o S; X ₃ es T o V; X ₄ es D o G; X ₅ es Q o L; X ₆ es S o T; X ₇ es R o G; X ₈ es K o E; X ₉ es A o V; X ₁₀ es H o Q; y X ₁₁ es Q o S	91

Clon de VL	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VL consenso	DIVMTQSPX ₁ SLX ₂ VX ₃ PGESASISCKTSQGLVHSX ₄ GKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFX ₅ GSGSGTDFTLKISX ₆ V X ₇ AEDX ₈ GVYYCAX ₉ GTYYPHTFGX ₁₀ GTRLEIK, en donde X ₁ es L o G; X ₂ es P o S; X ₃ es T o V; X ₄ es D o G; X ₅ es S o T; X ₆ es R o G; X ₇ es K o E; X ₈ es A o V; X ₉ es H o Q; y X ₁₀ es Q o S	92
mAb1_VL, mAb3_VL, mAb5_VL	DIVMTQSPLSLPVTTPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	58
mAb2_VL, mAb4_VL, mAb6_VL, mAb7_VL	DIVMTQSPLSLPVTTPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	54
mAb8_VL, mAb10_VL	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	59
mAb9_VL, mAb11_VL	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	60
mAb12_VL	DIVMTQSPLSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	61
mAb13_VL, mAb14_VL	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQKPGQSPQLLIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	62

Clon de VL	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
mAb15_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDAGVYYCAQGTYYPHTFGSGTRLEIK	63
mAb16_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGSGTRLEIK	55
mAb17_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDAGVYYCAQGTYYPHTFGQGTRLEIK	64
mAb18_VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	56
mAb19_VL	DIVMTQSPGSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGV EAEDAGVYYCAQGTYYPHTFGQGTRLEIK	65
mAb20_VL	DIVMTQSPGSLSVTPGEPASISCKTSQGLVHSGGKTYFYWFL QKPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFTGSGSGTDFTLKISGV EAEDAGVYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIK	57

Tabla 12. Secuencias de VH y VL de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares.

Anticuerpo	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
mAb1	mAb1_VH	46	mAb1_VL	58
mAb2	mAb2_VH	46	mAb2_VL	54
mAb3	mAb3_VH	47	mAb3_VL	58
mAb4	mAb4_VH	47	mAb4_VL	54
mAb5	mAb5_VH	48	mAb5_VL	58
mAb6	mAb6_VH	48	mAb6_VL	54
mAb7	mAb7_VH	42	mAb7_VL	54
mAb8	mAb8_VH	49	mAb8_VL	59
mAb9	mAb9_VH	49	mAb9_VL	60
mAb10	mAb10_VH	50	mAb10_VL	59
mAb11	mAb11_VH	50	mAb11_VL	60

Anticuerpo	VH	SEQ ID NO	VL	SEQ ID NO
mAb12	mAb12_VH	51	mAb12_VL	61
mAb13	mAb13_VH	52	mAb13_VL	62
mAb14	mAb14_VH	53	mAb14_VL	62
mAb15	mAb15_VH	43	mAb15_VL	63
mAb16	mAb16_VH	43	mAb16_VL	55
mAb17	mAb17_VH	44	mAb17_VL	64
mAb18	mAb18_VH	44	mAb18_VL	56
mAb19	mAb19_VH	45	mAb19_VL	65
mAb20	mAb20_VH	45	mAb20_VL	57

Tabla 13. Secuencias completas de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados ejemplares.

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
cadena pesada de mAb7 IgG ₁	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	66

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
cadena pesada de mAb7 IgG ₁ Xtend	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV LHEALHSHYTQKSLSLSPG	67
cadena pesada de mAb7 IgG ₁ HNance	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALKFHYTQKSLSLSPG	68
cadena pesada de mAb7 IgG ₁ YTE	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG	69

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
	QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	
cadena pesada de mAb7 IgG ₄ S228P	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLSPG	70
cadena pesada de mAb7 IgG ₄ S228P Xtend	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV EALHSHYTQKSLSLSPG	71
cadena pesada de mAb7 IgG ₄ S228P HNance	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV	72

Cadena de anticuerpos	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
	VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALKFHYTQKSLSLSLG	
cadena pesada de mAb7 IgG ₄ S228P YTE	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTYSMRWVRQAPGK GLEWVSSIHTGGGGTAYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNN LRAEDTAIYYCVIAGYSDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLSLG	73
Cadena ligera de mAb7 Igk	DIVMTQSPLSLPVTPGESASISCKTSQGLVHSDGKTYFYWFLQ KPGQSPQQLIYQVSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VKA EDAGVYYCAHGTYYPHTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	74

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende una, dos, o las tres CDR de un dominio VH establecido en la Tabla 3 o 10 en la presente descripción. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende la CDRH1 de uno de los dominios VH establecidos en la Tabla 3 o 10. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende la CDRH2 de uno de los dominios VH establecidos en la Tabla 3 o 10. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende la CDRH3 de uno de los dominios VH establecidos en la Tabla 3 o 10.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que

se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende un dominio VL que comprende una, dos, o las tres CDR de un dominio VL descrito en la Tabla 4 u 11 en la presente descripción. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende la CDRL1 de uno de los dominios VL establecidos en la Tabla 4 u 11. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende la CDRL2 de uno de los dominios VL establecidos en la Tabla 4 u 11. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende la CDRL3 de uno de los dominios VL establecidos en la Tabla 4 u 11.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3, respectivamente, de un anticuerpo establecido en las Tablas 5 o 12.

En ciertas modalidades, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con Kabat y otros, J. Biol. Chem 252, 6609-6616 (1977) y Kabat y otros, Sequences of protein of immunological interest (1991). En ciertas modalidades, las CDR de cadena ligera de un anticuerpo se determinan de acuerdo con Kabat y las CDR de cadena pesada de un anticuerpo se determinan de acuerdo con MacCallum (*supra*).

En ciertas modalidades, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de los lazos estructurales de inmunoglobulina (ver, por ejemplo, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901- 917; Al-Lazikani B y otros, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C y otros, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A y otros, (1990) J Mol Biol 215 (1): 175-82; y patente de los EE. UU. núm. 7,709,226). Típicamente, cuando se usa la convención de numeración de Kabat, el lazo CDRH1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada del 26 al 32, 33, o 34, el lazo CDRH2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada del 52 al 56 y el lazo CDRH3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada del 95 al 102, mientras que el lazo CDRL1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera del 24 al 34, el lazo CDRL2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera del 50 al 56, y el lazo CDRL3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera del 89 al 97. El final del lazo CDRH1 de Chothia cuando se numera mediante el uso de la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 en dependencia de la

longitud del lazo (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el lazo termina en 32; si solo está presente 35A, el lazo termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el lazo termina en 34).

En ciertas modalidades, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT como se describe en Lefranc MP, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 y Lefranc MP y otros, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. De acuerdo con el esquema de numeración de IMGT, CDRH1 está en las posiciones 26 a 35, CDRH2 está en las posiciones 51 a 57, CDRH3 está en las posiciones 93 a 102, CDRL1 está en las posiciones 27 a 32, CDRL2 está en las posiciones 50 a 52 y CDRL3 está en las posiciones 89 a 97.

En ciertas modalidades, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con el esquema de numeración de AbM, que se refiere a regiones hipervariables de AbM, que representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los lazos estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.).

En ciertas modalidades, las CDR de un anticuerpo pueden determinarse de acuerdo con MacCallum RM y otros, (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. Ver, además, por ejemplo, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," en *Antibody Engineering*, Kontermann y Dübel, eds., Capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001).

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRH1, CDRH2, y CDRH3 de un dominio VH establecidas en la Tabla 3, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRL1, CDRL2, y CDRL3 de un dominio VL establecidas en la Tabla 4, caracterizadas porque cada CDR se define independientemente de acuerdo con la definición de Kabat, Chothia, IMGT, MacCallum, o AbM de un CDR, como se describe en la presente descripción.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de

complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIX₁TX₂X₃GGTAYRDSVKG, en donde X₁ es S o H, X₂ es G, E o D y X₃ es G o A (SEQ ID NO: 93);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de X₄GYSD, en donde X₄ es A o H (SEQ ID NO: 5);
- (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSX₅GKTYFY, en donde X₅ es D o G (SEQ ID NO: 88);
- (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
- (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AX₆GTYYPHT, en donde X₆ es Q o H (SEQ ID NO: 8),

y en donde al menos uno de X₁, X₄, y X₆ es H.

En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39), SISTDGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 9), o SIHTDGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 11).

En ciertas modalidades, CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10) o HGYS (SEQ ID NO: 12).

En ciertas modalidades, CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) o KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40).

En ciertas modalidades, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) o AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 36, y 10; 3, 37, y 10; 3, 38, y 10; 3, 39, y 10; 3, 9, y 10; 3, 11, y 10; 3, 9, y 12; o 3, 11, y 12, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende un dominio VL que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 establecidas en las SEQ ID NO: 6, 7, y 14; 40, 7, y 14; 40, 7, y 13; o 6, 7, y 13, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por

ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85%, 90 %, 95%, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17, o 18. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17, o 18.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19, o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19, o 20.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17, o 18, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19, o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 15, 16, 17, o 18, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 19, o 20.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por

ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTX₁X₂GGTAYRDSVKG, en donde X₁ es G, E, o D, y X₂ es G o A (SEQ ID NO: 87);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);
- (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSXGKTYFY, en donde X es D o G (SEQ ID NO: 88);
- (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
- (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AXGTYYPHT, en donde X es Q o H (SEQ ID NO: 8).

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), o SIHTEGGGTAYRDS (SEQ ID NO: 39);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de AGYSD (SEQ ID NO: 10);
- (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) o KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40);
- (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
- (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) o AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37), SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38), o SIHTEGGGTAYR (SEQ IDGGTAYR 39). En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36), SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO:

37), o SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38). En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTGGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 36). En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTEAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 37). En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTDAGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 38). En ciertas modalidades, CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIHTEGGGTAYRDSVKG (SEQ ID NO: 39).

En ciertas modalidades, CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6) o KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40). En ciertas modalidades, CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6). En ciertas modalidades, CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSGGKTYFY (SEQ ID NO: 40).

En ciertas modalidades, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14) o AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13). En ciertas modalidades, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AHGTYYPHT (SEQ ID NO: 14). En ciertas modalidades, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AQGTYYPHT (SEQ ID NO: 13).

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en SEQ ID NO: 3, 36, y 10; 3, 37, y 10; 3, 38, y 10; o 3, 39, y 10, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VH comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 36, y 10, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VH comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 37, y 10, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VH comprende las secuencias de aminoácidos CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 38, y 10, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende un dominio VL que comprende las secuencias de aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 establecidas en las SEQ ID NO: 6, 7, y 14; 40, 7, y 14; o 40, 7, y 13, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VL comprende las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 establecidas en las SEQ ID NO: 6, 7, y 14, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VL comprende las secuencias de

aminoácidos CDRL1, CDRL2 y CDRL3 establecidas en SEQ ID NO: 40, 7, y 14, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 36, 10, 6, 7, y 14; 3, 37, 10, 40, 7, y 14; 3, 38, 10, 40, 7, y 14; 3, 39, 10, 6, 7, y 14; 3, 37, 10, 40, 7, y 13; o 3, 38, 10, 40, 7, y 13, respectivamente. En ciertas modalidades, las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 36, 10, 6, 7, y 14, respectivamente. En ciertas modalidades, las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 37, 10, 40, 7, y 14, respectivamente. En ciertas modalidades, las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 38, 10, 40, 7, y 14, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89, o 90. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89, o 90. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 43. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 44. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 45. En ciertas modalidades, el anticuerpo

comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 46. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 47. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 48. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 49. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 50. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 51. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 52. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 53. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 89, opcionalmente en donde la región variable de cadena pesada no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 90, opcionalmente en donde la región variable de cadena pesada no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91, o 92. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91, o 92. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de

aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 55. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 56. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 57. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 58. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 59. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 60. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 61. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 62. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 63. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 64. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 65. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 91. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 92.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado (por ejemplo, un anticuerpo humanizado) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89, o 90, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91, o 92. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 89, o 90, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 91, o 92. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 42 y 54, 43 y 55, 44 y 56, 45 y 57, 46 y 58, 46 y 54, 47 y 58, 47 y 54, 48 y 58, 48 y 54, 49 y 59, 49 y 60, 50 y 59, 50 y 60, 51 y 61, 52 y 62, 53 y 62, 43 y 63, 44 y 64, 45 y 65, 89 y 91, o 90 y 92, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 42 y 54, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 43 y 55, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 44 y 56, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 45 y 57, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 46 y 58, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 46 y 54, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 47 y 58, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 47 y 54, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 48 y 58, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 48 y 54, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo

comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 49 y 59, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 49 y 60, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 50 y 59, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 50 y 60, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 51 y 61, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 52 y 62, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 53 y 62, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 43 y 63, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 44 y 64, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 45 y 65, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 89 y 91, respectivamente, opcionalmente en donde la región variable de cadena pesada no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 90 y 92, respectivamente, opcionalmente en donde la región variable de cadena pesada no comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o

18.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y en donde:

- (a) la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIX₁TDGGGTAYRDSVKG, en donde X₁ es S o H (SEQ ID NO: 4);
- (c) la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de X₂GYSD, en donde X₂ es A o H (SEQ ID NO: 5);
- (d) la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);
- (e) la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y/o
- (f) la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AX₃GTYPHT, en donde X₃ es Q o H (SEQ ID NO: 8).

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y en donde:

- (a) la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de TYSMR (SEQ ID NO: 3);
- (b) la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SIX₁TDGGGTAYRDSVKG, en donde X₁ es S o H (SEQ ID NO: 4);
- (c) la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de X₂GYSD, en donde X₂ es A o H (SEQ ID NO: 5);
- (d) la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de KTSQGLVHSDGKTYFY (SEQ ID NO: 6);
- (e) la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de QVSNRAS (SEQ ID NO: 7); y
- (f) la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de AX₃GTYPHT, en donde X₃ es Q o H (SEQ ID NO: 8),

y en donde al menos uno de X_1 , X_2 , y X_3 es H.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende:

- (a) una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- (b) una CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 u 11;
- (c) una CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12;
- (d) una CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- (e) una CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y/o
- (f) una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o 14.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), el anticuerpo comprende:

- (a) una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- (b) una CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 u 11;
- (c) una CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 12;
- (d) una CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- (e) una CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y
- (f) una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o 14,

y en donde el anticuerpo aislado no comprende las secuencias de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 9, 10, 6, 7, y 13, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 9, y 10; 3, 11, y 10; 3, 9 y 12; o 3, 11, y 12, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VH comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 11, y 10, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VH comprende las

secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 9, y 12, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VH comprende las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3 establecidas en las SEQ ID NO: 3, 11, y 12, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende un dominio VL que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 establecidas en las SEQ ID NO: 6, 7, y 13; o 6, 7, y 14, respectivamente. En ciertas modalidades, el dominio VL comprende las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3 establecidas en las SEQ ID NO: 6, 7, y 14, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 11, 10, 6, 7, y 13; 3, 9, 12, 6, 7, y 13; 3, 9, 10, 6, 7, y 14; 3, 11, 10, 6, 7, y 14; 3, 9, 12, 6, 7, y 14; 3, 11, 12, 6, 7, y 13; o 3, 11, 12, 6, 7, y 13, respectivamente. En ciertas modalidades, las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 11, 10, 6, 7 y 14, respectivamente. En ciertas modalidades, las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 3, 9, 12, 6, 7 y 14, respectivamente.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica al conjunto de secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 16. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 17. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 18.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 19 o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 20.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (por ejemplo, al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 19 o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, 16, 17, o 18, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 19 o 20. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 16 y 19, 17 y 19, 18 y 19, 15 y 20, 16 y 20, 17 y 20, o 18 y 20, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 16 y 20, respectivamente. En ciertas modalidades, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 17 y 20, respectivamente. Puede usarse cualquier región constante de Ig en los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción. En ciertas modalidades, la región constante de Ig es una región constante de la molécula de inmunoglobulina (Ig) IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, o IgY humana,

y/o una región constante de cualquier clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂) o cualquier subclase (por ejemplo, IgG_{2a} e IgG_{2b}) de la molécula de inmunoglobulina. En ciertas modalidades, la región constante de Ig es una región constante de Ig humana o humanizada.

En ciertas modalidades, la región constante es una variante de una región constante de cadena pesada de Ig humana (por ejemplo, IgG) de tipo salvaje, y en donde la región constante de cadena pesada de la Ig humana variante tiene una afinidad aumentada (por ejemplo, aumenta al menos en al menos 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o 20 veces) por el receptor de Fc neonatal humano (FcRn) a pH ácido (por ejemplo, de pH 5.5 a pH 6) en relación con la afinidad de la región constante de cadena pesada de la Ig humana de tipo salvaje correspondiente por el FcRn humano en las mismas condiciones. En ciertas modalidades, la región constante de cadena pesada de la Ig humana variante tiene una afinidad similar o disminuida (por ejemplo, aumentada en no más de 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, o 2 veces, igual a, o disminuida) por el receptor de Fc neonatal humano (FcRn) a pH fisiológico (por ejemplo, a pH 7.4) en relación con la afinidad de la región constante de cadena pesada de la Ig humana de tipo salvaje por el FcRn humano en las mismas condiciones. En ciertas modalidades, la región constante comprende uno, dos, o más aminoácidos (por ejemplo, que tienen una o más sustituciones, inserciones o deleciones) de un dominio constante de Ig de tipo salvaje Ig (por ejemplo, IgG) o fragmento de unión a FcRn de esta (por ejemplo, un fragmento de dominio bisagra-Fc o Fc). En ciertas modalidades, la vida media del anticuerpo con la región constante variante *in vivo* aumenta en relación con la vida media del anticuerpo correspondiente con el dominio constante de tipo salvaje o fragmento de unión a FcRn de este *in vivo*. Ver, por ejemplo, las publicaciones internacionales núm. WO 02/060919; WO 98/23289; y WO 97/34631; y las patentes de EE. UU. núm. 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375, 6,165,745, 8,088,376, y 8,163,881, todas las cuales se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia, para ejemplos de mutaciones que aumentarán la vida media de un anticuerpo *in vivo*. En cierta modalidad, el uno o más diferentes de aminoácidos están en el segundo dominio constante (CH2) (residuos 231-340 de la IgG₁ humana) y/o el tercer dominio constante (CH3) (residuos 341-447 de la IgG₁ humana), numerados de acuerdo con el sistema de numeración de EU. En ciertas modalidades, la región constante de la IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂ o IgG₄) de un anticuerpo descrito en la presente descripción comprende los aminoácidos tirosina (Y) treonina (T), y ácido glutámico (E) en las posiciones 252, 254, y 256, respectivamente, numerados de

acuerdo con el sistema de numeración de EU. Ver la patente de EE. UU: núm. 7,658,921, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia. Se demostró que este tipo de IgG, denominado "YTE IgG", muestra una vida media cuatro veces mayor en comparación con las versiones de tipo salvaje del mismo anticuerpo (ver Dall'Acqua WF y otros, (2006) J Biol Chem 281: 23514-24, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia). En ciertas modalidades, la región constante de la IgG (por ejemplo, IgG₁) de un anticuerpo descrito en la presente descripción comprende el aminoácido alanina (A), serina (S), tirosina (Y), o fenilalanina (F) en la posición 434, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de EU. En ciertas modalidades, la región constante de la IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, o IgG₄) de un anticuerpo descrito en la presente descripción comprende los aminoácidos lisina (K), fenilalanina (F), y tirosina (Y) en las posiciones 433, 434, y 436, respectivamente, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de EU. En ciertas modalidades, la región constante de la IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, o IgG₄) de un anticuerpo descrito en la presente descripción comprende los aminoácidos leucina (L) y serina (S) en las posiciones 428 y 434, respectivamente, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de EU. Las regiones constantes de IgG adicionales que pueden tener una mayor afinidad por FcRn en condiciones ácidas se describen en Ward y otros, Mol. Immunol. (2015) 67(200):131-41, que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia. En ciertas modalidades, un anticuerpo comprende un dominio constante de IgG que comprende una, dos, tres o más sustituciones aminoacídicas de residuos aminoacídicos en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-436, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de EU. En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción comprenden una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, u 86. En ciertas modalidades, los anticuerpos aislados descritos en la presente descripción comprenden una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25 o 26.

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, o 73. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo,

ApoC3 humana), que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 74. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 66 y 74, 67 y 74, 68 y 74, 69 y 74, 70 y 74, 71 y 74, 72 y 74, o 73 y 74, respectivamente. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, o 34. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 35. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), que comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ ID NO: 27 y 35, 28 y 35, 29 y 35, 30 y 35, 31 y 35, 32 y 35, 33 y 35, o 34 y 35, respectivamente.

3. Métodos de uso

ApoC3 inhibe la absorción y eliminación de TRL (por ejemplo, VLDL) y restos de TRL en los hepatocitos e inhibe la lipólisis de TRL (por ejemplo, VLDL) mediada por la lipoproteína lipasa, de esa manera funciona para aumentar los niveles de triglicéridos en la sangre de un sujeto. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción pueden atenuar la capacidad de ApoC3 para inhibir la absorción y eliminación de TRL (por ejemplo, VLDL) y restos de TRL en los hepatocitos o atenuar la capacidad de ApoC3 para inhibir la lipólisis de TRL (por ejemplo, VLDL) mediada por la lipoproteína lipasa. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para inhibir la actividad de ApoC3 en la sangre de un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. En ciertas modalidades, la actividad de ApoC3 es la inhibición de la absorción y eliminación de TRL (por ejemplo, VLDL) y restos de TRL en los hepatocitos. En ciertas modalidades, la actividad de ApoC3 es la inhibición de la lipólisis de TRL mediada por la lipoproteína lipasa. En ciertas modalidades, la actividad de ApoC3 es la inhibición de la absorción y eliminación de TRL (por ejemplo, VLDL) y restos de TRL en los hepatocitos y la inhibición de la lipólisis de TRL mediada por la lipoproteína lipasa.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son útiles para aumentar la velocidad de eliminación de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) de la sangre en un sujeto. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para aumentar la velocidad de eliminación de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) de la sangre en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son útiles para reducir el nivel de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para reducir el nivel de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. En ciertas modalidades, el método reduce el nivel de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto en al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, el método reduce los niveles de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre de un sujeto en al menos aproximadamente 1.1 veces, 1.2 veces, 1.3 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces, según lo evaluado por los métodos descritos en la presente descripción o por métodos conocidos por un experto en la técnica. En ciertas modalidades, la reducción en los niveles de ApoC3 y/o ApoB (por ejemplo, ApoB48 y/o ApoB100) en la sangre en el sujeto se mantiene durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 semanas.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son útiles para reducir los niveles de triglicéridos en la sangre de un sujeto. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para reducir los niveles de triglicéridos en la sangre de un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son útiles para el

tratamiento de la hipertrigliceridemia. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar la hipertrigliceridemia en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar la quilomicronemia en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar el síndrome de quilomicronemia en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son útiles para el tratamiento y prevención de la lipemia posprandial en un sujeto. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para inhibir la lipemia posprandial en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. El anticuerpo anti-ApoC3 puede administrarse al sujeto antes, durante, o después de una comida.

Sin desear limitarse a la teoría, los solicitantes creen que, en ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción son capaces de reducir los niveles de quilomicron o restos de quilomicron posprandiales en un sujeto cuando se administra al sujeto antes, durante, o después de una comida. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para reducir los niveles de quilomicron o restos de quilomicron posprandiales en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. El anticuerpo anti-ApoC3 puede administrarse al sujeto antes, durante, o después de una comida.

La reducción de los niveles de triglicéridos en sangre en pacientes con hipertrigliceridemia puede reducir el riesgo de desarrollar pancreatitis. En consecuencia, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona un método para reducir el riesgo de pancreatitis en un sujeto con hipertrigliceridemia, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción son útiles para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular en un sujeto. En consecuencia, en ciertas

modalidades, la presente descripción proporciona un método para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular en un sujeto con hipertrigliceridemia, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. El riesgo de desarrollar cualquier enfermedad cardiovascular asociada o causada por hipertrigliceridemia o lipemia postprandial excesiva puede reducirse mediante la administración de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción. Las enfermedades cardiovasculares para las cuales puede reducirse el riesgo incluyen sin limitación la enfermedad de la arteria coronaria, aterosclerosis, angina, infarto de miocardio, y accidente cerebrovascular.

Los anticuerpos anti-ApoC3 o las composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción pueden administrarse solos o en combinación con un agente terapéutico adicional. En ciertas modalidades, el agente terapéutico adicional es otro agente hipolipemiante. Pueden usarse uno o más agentes hipolipemiantes en combinación con un anticuerpo anti-ApoC3 o una composición farmacéutica descrita en la presente descripción. Los agentes hipolipemiantes adecuados incluyen, entre otros, inhibidores de la HMG-CoA reductasa (por ejemplo, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina o simvastatina), fibratos, niacina, secuestrantes de ácidos biliares (por ejemplo, colestiramina, colestipol, y colesevelam), inhibidores de la absorción de colesterol en la dieta (por ejemplo, ezetimiba), inhibidores de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP) (por ejemplo, lomitapida), fitoesteros, inhibidores de la lipasa pancreática (por ejemplo, orlistat), inhibidores de la proteína de transferencia de colesterol éster, inhibidores de la escualeno sintasa (por ejemplo, TAK-475, ácido zaragózico, y RPR 107393), ApoA-1 Milano, succinobucol(AGI-1067), inhibidores de la apoproteína B (por ejemplo, Mipomersen), e inhibidores de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) (por ejemplo, alirocumab, evolocumab y bococizumab). En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante adicional es una combinación de ezetimiba y un inhibidor de la HMG-CoA reductasa. En ciertas modalidades, el agente hipolipemiante es una combinación de ezetimiba, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, y un inhibidor de PCSK9.

Los anticuerpos anti-ApoC3 o composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden administrarse a un sujeto mediante una variedad de rutas. Estos incluyen, pero no se limitan a, rutas parenterales, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, y subcutáneas. En ciertas modalidades, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en la presente descripción se administra por

subcutáneamente o intravenosamente.

La cantidad de un anticuerpo anti-ApoC3 o composición farmacéutica descrita en la presente descripción que será efectiva en el tratamiento o prevención de una afección dependerá de la naturaleza de la enfermedad, y puede determinarse empíricamente por técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se empleará en una composición dependerá, además, de la ruta de administración y la gravedad de la infección o enfermedad causada por ella, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada sujeto. Por ejemplo, las dosis efectivas pueden variar, además, en dependencia de los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente (incluida la edad, peso corporal y salud), si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados, o si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Los anticuerpos anti-ApoC3 o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden administrarse a cualquier frecuencia (por ejemplo, aproximadamente cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada mes, o cada dos meses). Usualmente, el paciente es un ser humano, pero pueden tratarse, además, mamíferos no humanos incluidos los mamíferos transgénicos. Las dosis y regímenes de tratamiento se ajustan de óptimamente para optimizar la seguridad y la eficacia.

Los anticuerpos anti- ApoC3 descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para ensayar los niveles de proteína ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) en una muestra biológica mediante el uso de métodos clásicos inmunohistológicos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunoprecipitación, o transferencia Western. Los marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados se conocen en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. Tales marcadores pueden usarse para marcar un anticuerpo descrito en la presente descripción. Alternativamente, un segundo anticuerpo que reconoce un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción puede marcarse y usarse en combinación con un anticuerpo anti-ApoC3 para detectar los niveles de proteína ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana).

El ensayo para el nivel de expresión de la proteína ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) pretende incluir la medición o estimación cualitativa o cuantitativa del nivel de proteína ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) en una primera muestra biológica ya sea

directamente (por ejemplo, por la determinación o estimación del nivel absoluto de proteína) o relativamente (por ejemplo, mediante la comparación del nivel de proteína asociado a la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) en la primera muestra biológica puede medirse o estimarse y compararse con un nivel estándar de proteína ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), al tomar el estándar de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o se determina por el promedio de los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido ApoC3 “estándar” (por ejemplo, ApoC3 humana), este puede usarse repetidamente como un estándar para comparación.

Como se usa en la presente descripción, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto, línea celular, tejido, u otra fuente de células que potencialmente expresan ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de animales (por ejemplo, humanos) se conocen bien en la técnica. Las muestras biológicas incluyen células de la sangre mononucleares periféricas.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción pueden usarse para aplicaciones de pronóstico, diagnóstico, monitorización y detección, incluidas aplicaciones *in vitro* e *in vivo* estándar y bien conocidas para el experto en la técnica y basadas en la presente descripción. Los ensayos y kits de pronóstico, diagnóstico, monitoreo y detección para la evaluación y valoración *in vitro* del estado del sistema inmune o la respuesta inmune pueden utilizarse para predecir, diagnosticar, y monitorear para evaluar las muestras de pacientes, incluidas las que se sabe que tienen o se sospecha que tienen actividad elevada de ApoC3. En una modalidad, puede usarse un anticuerpo anti-ApoC3 en la inmunohistoquímica de muestras de biopsia. En otra modalidad, puede usarse un anticuerpo anti-ApoC3 para detectar niveles de ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), cuyos niveles pueden vincularse a ciertos síntomas de la enfermedad. Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción pueden portar un marcador detectable o funcional. Cuando se usan marcadores de fluorescencia, puede utilizarse la microscopía disponible actualmente y el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la combinación de ambos procedimientos conocidos en la técnica para identificar y cuantificar los miembros de unión específicos. Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción pueden portar un marcador de fluorescencia. Los marcadores de fluorescencia

ejemplares incluyen, por ejemplo, sondas conjugadas y reactivas, por ejemplo, aminocumarina, fluoresceína y rojo de Texas, colorantes Alexa Fluor, colorantes Cy y colorantes DyLight. Un anticuerpo anti-ApoC3 puede portar un marcador radiactivo, tales como los isótopos ^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 y ^{186}Re . Cuando se usan marcadores radiactivos, los procedimientos de conteo disponibles actualmente conocidos en la técnica pueden utilizarse para identificar y cuantificar la unión específica del anticuerpo anti-ApoC3 a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). En el caso en el que el marcador sea una enzima, la detección puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluorospectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente como se conoce en la técnica. Esto puede lograrse mediante la puesta en contacto de una muestra o una muestra de control con un anticuerpo anti-ApoC3 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) se detecta y compara en la muestra y el control. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para purificar ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) mediante purificación por inmutafinidad. Se incluye en la presente descripción, además, un sistema de ensayo que puede prepararse en forma de un kit de prueba para el análisis cuantitativo del alcance de la presencia de, por ejemplo, ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). El sistema o kit de prueba puede comprender un componente marcado, por ejemplo, un anticuerpo ApoC3 marcado, y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales.

4. Composiciones farmacéuticas

En la presente descripción se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción que tiene el grado de pureza deseado en un vehículo, excipiente o estabilizador fisiológicamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de

aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como gelatina, inmunoglobulinas, o albúmina en suero; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluidos glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

En una modalidad específica, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción, y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad específica, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad efectiva de un anticuerpo descrito en la presente descripción, y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el anticuerpo es el único ingrediente activo incluido en la composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden ser útiles para inhibir la actividad de ApoC3 y tratar una afección, tal como cáncer o una enfermedad infecciosa. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestradores o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y Ringer con lactato. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de maní. Pueden adicionarse agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los

agentes emulsionantes incluyen polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrador o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos incluyen, además, alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua; e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH. Puede formularse una composición farmacéutica para cualquier ruta de administración a un sujeto. Ejemplos específicos de rutas de administración incluyen intranasal, oral, pulmonar, transdérmica, intradérmica, y parenteral. La administración parenteral, caracterizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, se contempla, además, en la presente descripción. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los inyectables, soluciones y emulsiones contienen, además, uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. En adición, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener, además, cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes similares, tales como por ejemplo acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

Las preparaciones para la administración parenteral de un anticuerpo incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos estériles solubles secos, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un solvente justo antes de su uso, incluidas tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para inyección, productos estériles insolubles secos listos para combinar con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

Si se administran intravenosamente, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, y polipropilenglicol y mezclas de estos.

Las mezclas tópicas que comprenden un anticuerpo se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o lo similar y puede formularse como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción puede formularse como un aerosol para aplicación tópica, tal como por inhalación (ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núm. 4,044,126, 4,414,209 y 4,364,923, que describen aerosoles para la administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para la administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflaciones, solo o en combinación con un vehículo inerte como la lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán, en una modalidad, diámetros de menos de 50 micras, en una modalidad menos de 10 micras.

Un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción puede formularse para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica en la piel y las membranas mucosas, tal como en el ojo, en la forma de geles, cremas, y lociones y para aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para la administración transdérmica y, además, para la administración a los ojos o la mucosa, o para terapias de inhalación. Pueden administrarse, además, soluciones nasales del anticuerpo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los parches transdérmicos, incluidos dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, se conocen bien por los expertos en la técnica y pueden usarse para administrar un anticuerpo. Por ejemplo, tales parches se describen en las patentes de EE. UU. núm. 6,267,983, 6,261,595, 6,256,533, 6,167,301, 6,024,975, 6,010,715, 5,985,317, 5,983,134, 5,948,433, y 5,860,957.

En ciertas modalidades, una composición farmacéutica que comprende una descrita en la presente descripción es un polvo liofilizado, que puede reconstituirse para administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. Además, puede reconstituirse y formularse como sólidos o geles. El polvo liofilizado se prepara mediante la disolución de un anticuerpo descrito en la presente descripción, o un derivado farmacéuticamente aceptable de este, en un solvente adecuado. En algunas modalidades, el polvo liofilizado es estéril. El solvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El solvente puede contener, además, un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón conocido por los expertos en la técnica a, en una modalidad, aproximadamente pH neutro. La filtración estéril posterior

de la solución seguida de liofilización en condiciones estándar conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. En una modalidad, la solución resultante se distribuirá en viales para liofilización. Cada vial contendrá una dosis única o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tal como de aproximadamente 4 °C hasta temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para uso en la administración parenteral. Para la reconstitución, el polvo liofilizado se adiciona a agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Tal cantidad puede determinarse empíricamente.

Los anticuerpos anti-ApoC3 descritos en la presente descripción y otras composiciones proporcionadas en la presente descripción pueden formularse, además, para dirigirse a un tejido, receptor u otra área particular del cuerpo del sujeto a tratar. Muchos de tales métodos de orientación se conocen bien por los expertos en la técnica. Todos estos métodos de direccionamiento se contemplan en la presente descripción para su uso en las composiciones instantáneas. Para ejemplos no limitantes de métodos de direccionamiento, ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núm. 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674, 5,759,542 y 5,709,874.

Las composiciones a usar para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estériles.

5. Polinucleótidos, vectores y métodos para producir anticuerpos anti-ApoC3

En otro aspecto, se proporcionan en la presente descripción polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción (por ejemplo, una región variable de cadena ligera o región variable de cadena pesada), y vectores, por ejemplo, vectores que comprenden tales polinucleótidos para la expresión recombinante en células huésped (por ejemplo, *E. coli* y células de mamífero).

Como se usa en la presente descripción, una molécula de polinucleótido o ácido nucleico “aislada” es una que se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural (por ejemplo, en un ratón o un ser humano) de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio

de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, el término “sustancialmente libre” incluye preparaciones de polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico que tienen menos de aproximadamente 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, o 0.1 % (en particular, menos de aproximadamente 10 %) de otro material, por ejemplo, material celular, medio de cultivo, otras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos u otros productos químicos. En una modalidad específica, una(s) molécula(s) de ácido nucleico que codifica un anticuerpo descrito en la presente descripción se aísla o purifica.

En aspectos particulares, se proporcionan en la presente descripción polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos, que se unen específicamente al polipéptido ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) y comprenden una secuencia de aminoácidos como se describe en la presente descripción, así como anticuerpos que compiten con tales anticuerpos por unirse al polipéptido ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis), o que se une al mismo epítipo al que se unen tales anticuerpos.

En ciertos aspectos, se proporcionan en la presente descripción polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente descripción. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican las VH, VL o CDR de los anticuerpos descritos en la presente descripción (ver, por ejemplo, las Tablas 1-4 en la presente descripción).

Se proporcionan en la presente descripción, además, polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-ApoC3 que se optimizan, por ejemplo, mediante optimización de codones/ARN, reemplazo con secuencias de señal heterólogas, y eliminación de elementos de inestabilidad del ARNm. Los métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo anti-ApoC3 (por ejemplo, cadena ligera, cadena pesada, dominio VH, o dominio VL) para la expresión recombinante mediante la introducción de cambios de codones o la eliminación de regiones inhibitoras en el ARNm pueden llevarse a cabo mediante la adaptación de la optimización de métodos descritos, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. núm. 5,965,726; 6,174,666; 6,291,664; 6,414,132; y 6,794,498, en consecuencia. Por ejemplo, los sitios potenciales de corte y empalme y los elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o A/U) dentro del ARN pueden mutarse sin alterar los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico para aumentar la estabilidad del ARN para la expresión

recombinante. Las alteraciones utilizan la degeneración del código genético, por ejemplo, mediante el uso de un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunas modalidades, puede ser deseable alterar uno o más codones para codificar una mutación conservadora, por ejemplo, un aminoácido similar con estructura y propiedades químicas o función al aminoácido original. Tales métodos pueden aumentar la expresión de un anti-ApoC3 en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces o más en relación con la expresión de un anticuerpo anti-ApoC3 codificado por polinucleótidos que no se optimizaron.

En ciertas modalidades, una secuencia de polinucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción (por ejemplo, dominio VL o dominio VH) puede hibridarse con un polinucleótido antisentido (por ejemplo, complementario) de una secuencia de polinucleótido no optimizada que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción (por ejemplo, dominio VL o dominio VH). En modalidades específicas, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción o un fragmento se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con un polinucleótido antisentido de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción. En una modalidad específica, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción se hibrida en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o baja con un polinucleótido antisentido de una secuencia de nucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción. Se describió información sobre las condiciones de hibridación, ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. núm. US 2005/0048549 (por ejemplo, párrafos 72-73), que se incorpora en la presente descripción como referencia.

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos puede determinarse, por cualquier método conocido en la técnica. Las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente descripción, por ejemplo, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, y versiones modificadas de estos anticuerpos pueden determinarse mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica, es decir, los codones de nucleótidos que se conoce que codifican aminoácidos particulares se ensamblan de tal manera que generan un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Tal polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo,

como se describe en Kutmeier G y otros, (1994), BioTechniques 17: 242-6), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, el alineamiento y el ligamiento de esos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente descripción puede generarse a partir de ácido nucleico a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, un hibridoma) mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica (por ejemplo, PCR y otros métodos de clonación molecular). Por ejemplo, la amplificación por PCR mediante el uso de cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de una secuencia conocida puede realizarse mediante el uso de ADN genómico obtenido de células de hibridoma que producen el anticuerpo de interés. Tales métodos de amplificación por PCR pueden usarse para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo. Tales métodos de amplificación por PCR pueden usarse para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la región de cadena ligera variable o la región de cadena pesada variable de un anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados pueden clonarse en vectores para expresión en células huésped y para clonación adicional, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente, ARN poli A+, aislado a partir de cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo descrito en la presente descripción) por amplificación por PCR mediante el uso de cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación mediante el uso de una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia génica particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse en vectores de clonación replicables mediante el uso de cualquier método que se conoce bien en la técnica.

El ADN que codifica los anticuerpos anti-ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) descritos en la presente descripción puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante el uso de

procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-ApoC3 (por ejemplo, para ApoC3 humana)). Las células de hibridoma pueden servir como fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células CHO del CHO GS System™ (Lonza)), o células de mieloma que de otro manera no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos anti-ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) en las células huésped recombinantes.

Para generar anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción, y una secuencia flanqueadora para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias de VH o VL en clones de scFv. Mediante la utilización de técnicas de clonación conocidas por los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de cadena pesada, por ejemplo, la región constante gamma 4 humana, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de cadena ligera, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. En ciertas modalidades, los vectores para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para la región variable, dominios constantes, y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL pueden clonarse, además, en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena ligera se cotransfectan después en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

El ADN puede modificarse, además, por ejemplo, mediante la sustitución con la secuencia codificante para los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en el lugar de las secuencias murinas, o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es de una inmunoglobulina.

Se proporcionan, además, polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o baja con polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente descripción. En modalidades específicas, los

polinucleótidos descritos en la presente descripción hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o baja con polinucleótidos que codifican un dominio VH o dominio VL proporcionado en la presente descripción.

Las condiciones de hibridación se describieron en la técnica y las conoce un experto en la técnica. Por ejemplo, la hibridación en condiciones rigurosas puede implicar la hibridación con ADN unido a un filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6 x a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC 0.2 x/SDS 0.1 % a aproximadamente 50-65 °C; la hibridación en condiciones altamente rigurosas puede implicar hibridación con ácido nucleico unido a un filtro en SSC 6 x a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en SSC 0.1 x/SDS 0.2 % a aproximadamente 68 °C. La hibridación en otras condiciones rigurosas se conocen por los expertos en la técnica y se describieron, ver, por ejemplo, Ausubel FM y otros, eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3.

En ciertos aspectos, se proporcionan en la presente descripción células (por ejemplo, células huésped) que expresan (por ejemplo, recombinantemente) anticuerpos descritos en la presente descripción que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) y vectores de expresión y polinucleótidos relacionados. En la presente descripción se proporcionan vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos anti-ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) o un fragmento para la expresión recombinante en células huésped, preferentemente, en células de mamífero. Se proporcionan en la presente descripción, además, células huésped que comprenden tales vectores para expresar de forma recombinante anticuerpos anti-ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) descritos en la presente descripción (por ejemplo, anticuerpo humano o humanizado). En un aspecto particular, se proporcionan en la presente descripción métodos para producir un anticuerpo descrito en la presente descripción, que comprenden expresar tal anticuerpo a partir de una célula huésped.

La expresión recombinante de un anticuerpo descrito en la presente descripción (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa, cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o un anticuerpo de cadena única descrito en la presente descripción) que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) implica la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se obtiene un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, la cadena pesada o ligera de un anticuerpo (por ejemplo, regiones variables de cadena pesada o

ligera) descrita en la presente descripción, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante mediante el uso de técnicas que se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, los métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, cadena ligera o cadena pesada) que codifica la secuencia de nucleótidos se describen en la presente descripción. Los métodos que se conocen bien por los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, cadenas ligeras o cadenas pesadas) y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Se proporcionan, además, vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo descrita en la presente descripción, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una CDR de cadena pesada o ligera, unidas operativamente a un promotor. Tales vectores pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (ver, por ejemplo, las publicaciones internacionales núm. WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de EE. UU: núm. 5,122,464) y regiones variables del anticuerpo pueden clonarse en tal vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa, o tanto la cadena pesada como la cadena ligera completa.

Un vector de expresión puede transferirse a una célula (por ejemplo, célula huésped) mediante técnicas convencionales y las células resultantes pueden cultivarse después mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo descrito en la presente descripción. Por lo tanto, en la presente descripción se proporcionan células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente descripción, o una cadena pesada o ligera de este, o un fragmento de este, o un anticuerpo de cadena única descrito en la presente descripción, unido operativamente a un promotor para la expresión de tales secuencias en la célula huésped. En ciertas modalidades, para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera, individualmente, pueden coexpresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación. En ciertas modalidades, una célula huésped contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto la cadena pesada como la cadena

ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción. En modalidades específicas, una célula huésped contiene dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente descripción, o un fragmento de este, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción, o un fragmento de este. En otras modalidades, una primera célula huésped comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente descripción, o un fragmento de este, y una segunda célula huésped comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción. En modalidades específicas, una cadena pesada/región variable de cadena pesada expresada por una primera célula asociada con una cadena ligera/región variable de la cadena ligera de una segunda célula para formar un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción. En ciertas modalidades, se proporciona en la presente descripción una población de células huésped que comprende tal primera célula huésped y tal segunda célula huésped.

En una modalidad particular, se proporciona en la presente descripción una población de vectores que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera/región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada/ región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión en el huésped para expresar las moléculas de anticuerpos descritas en la presente descripción (ver, por ejemplo, la patente de EE. UU. núm. 5,807,715). Tales sistemas de expresión en el huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero, además, representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo descrita en la presente descripción *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófagos recombinantes, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmidos que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levadura (por

ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión en levadura recombinante que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales (por ejemplo, algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS (por ejemplo, COS1 o COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa, y NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 y BMT10) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). En una modalidad específica, las células para expresar anticuerpos descritos en la presente descripción son células CHO, por ejemplo células CHO del CHO GS System™ (Lonza). En una modalidad particular, las células para expresar anticuerpos descritos en la presente descripción son células humanas, por ejemplo, líneas celulares humanas. En una modalidad específica, un vector de expresión en mamífero es pOptiVEC™ o pcDNA3.3. En una modalidad particular, las células bacterianas tales como *Escherichia coli* o células eucariotas (por ejemplo, células de mamíferos), especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor de genes temprano intermedio principal de citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking MK y Hofstetter H (1986) Gene 45: 101-5; y Cockett MI y otros, (1990) Biotechnology 8(7): 662-7). En ciertas modalidades, los anticuerpos descritos en la presente descripción se producen por células CHO o células NS0. En una modalidad específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos descritos en la presente descripción que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) se regula por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de

expresión en dependencia del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal un anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruether U y Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1791-1794), en el que la secuencia codificante de anticuerpos puede ligarse individualmente al vector en marco con la región codificante lac Z para que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye S e Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3101-3109; Van Heeke G y Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5503-5509); y los similar. Por ejemplo, los vectores pGEX pueden usarse, además, para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de agarosa glutatión en matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la proteasa del factor Xa o la trombina para que el producto génico objetivo clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por ejemplo, puede usarse como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamíferos, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación de anticuerpos de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) resultará en un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, ver Logan J y Shenk T (1984) PNAS 81 (12): 3655-9). Pueden requerirse, además, señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación

debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógena y codones de iniciación pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (ver, por ejemplo, Bitter G y otros, (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544).

En adición, puede elegirse una cepa de la célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraducciona de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Con este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células huésped de mamíferos incluyen pero no se limitan a células CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030, COS (por ejemplo, COS1 o COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 y HsS78Bst. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) descritos en la presente descripción se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

En una modalidad específica, los anticuerpos descritos en la presente descripción tienen contenido de fucosa reducido o ningún contenido de fucosa. Tales anticuerpos pueden producirse mediante el uso de técnicas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en células deficientes o que carecen de la capacidad de fucosilar. En un ejemplo específico, las líneas celulares con una eliminación de ambos alelos de la α 1,6-fucosiltransferasa pueden usarse para producir anticuerpos con contenido reducido de fucosa. El sistema Potelligent® (Lonza) es un ejemplo de un sistema tal que puede usarse para producir anticuerpos con contenido de fucosa reducida.

Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes,

pueden generarse células de expresión estables. Por ejemplo, pueden diseñarse por ingeniería genética líneas celulares que expresen de manera estable un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción. En modalidades específicas, una célula proporcionada en la presente descripción expresa de manera estable una cadena ligera/región variable de cadena ligera y una cadena pesada/región variable de cadena pesada que se asocian para formar un anticuerpo descrito en la presente descripción. En ciertos aspectos, en lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, *etc.*), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN/polinucleótido foráneo, puede permitirse que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de composiciones que interactúan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler M y otros, (1977) Cell 11(1): 223-32), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska EH y Szybalski W (1962) PNAS 48 (12): 2026-2034) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy I y otros, (1980) Cell 22(3): 817-23) en células tk-, hgp^{rt}- o apr^t-, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos puede usarse como base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler M y otros, (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K y otros, (1981) PNAS 78: 1527-31); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan RC y Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu GY y Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; y Morgan RA y Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ y Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); e *hygro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre RF y otros, (1984) Gene 30(1-3): 147-56). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de

ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado y tales métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel FM y otros, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli NC y otros, (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F y otros, (1981) *J Mol Biol* 150: 1-14, que se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante la amplificación de vectores (para una revisión, ver Bebbington CR y Hentschel CCG, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse GF y otros, (1983) *Mol Cell Biol* 3: 257-66).

La célula huésped puede cotransfectarse con dos o más vectores de expresión descritos en la presente descripción, el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Las células huésped pueden cotransfectarse con diferentes cantidades de los dos o más vectores de expresión. Por ejemplo, las células huésped pueden transfectarse con cualquiera de las siguientes proporciones de un primer vector de expresión y un segundo vector de expresión: 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 o 1:50.

Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot NJ (1986) *Nature* 322: 562-565; y Köhler G (1980) *PNAS* 77: 2197-2199). Las secuencias de codificación para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico. El vector de expresión puede ser monocistrónico o multicistrónico. Una construcción de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, o en el intervalo de 2-5, 5-10 o 10-20 genes/secuencias de

nucleótidos. Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico bicistrónica puede comprender en el siguiente orden un promotor, un primer gen (por ejemplo, la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente descripción) y un segundo gen y (por ejemplo, la cadena ligera de un anticuerpo descrito en la presente descripción). En tal vector de expresión, la transcripción de ambos genes puede conducirse por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen puede ser por un mecanismo de barrido dependiente de la caperuza y la traducción del ARNm del segundo gen puede ser por un mecanismo independiente de la caperuza, por ejemplo, por un IRES.

Una vez que una molécula de anticuerpo descrita en la presente descripción se produce por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de proteína A, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritos en la presente descripción o conocidos de otra manera en la técnica para facilitar la purificación.

En modalidades específicas, un anticuerpo descrito en la presente descripción se aísla o purifica. Generalmente, un anticuerpo aislado es uno que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con especificidades antigénicas diferentes a las del anticuerpo aislado. Por ejemplo, en una modalidad particular, una preparación de un anticuerpo descrito en la presente descripción está sustancialmente libre de material celular o precursores químicos. El término “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpos que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, o 0.1 % (en peso seco) de proteína heteróloga (denominada en la presente descripción, además, como una “proteína contaminante”) o variantes de un anticuerpo, por ejemplo, diferentes formas modificadas postraduccionales de un anticuerpo u otras versiones diferentes de un anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos). Cuando el anticuerpo se produce de manera recombinante, generalmente está, además, sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, 10 %, 2 %, 1 %, 0.5 %, o 0.1 % del

volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, generalmente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos, es decir, se separa de los precursores químicos u otros químicos que participan en la síntesis de la proteína. En consecuencia, tales preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, o 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos diferentes al anticuerpo de interés. En una modalidad específica, los anticuerpos descritos en la presente descripción se aíslan o purifican.

Los anticuerpos que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante. Los métodos descritos en la presente descripción emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácido nucleico, y campos relacionados dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en las referencias citadas en la presente descripción y se explican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Maniatis T y otros, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J y otros, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J y otros, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B. y otros, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En una modalidad específica, un anticuerpo descrito en la presente descripción es un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo recombinante) preparado, expresado, creado o aislado por cualquier medio que implique la creación, por ejemplo, mediante síntesis, ingeniería genética de secuencias de ADN. En ciertas modalidades, tal anticuerpo comprende secuencias (por ejemplo, secuencias de ADN o secuencias de aminoácidos) que no existen naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos de un animal o mamífero (por ejemplo, ser humano) *in vivo*.

En un aspecto, se proporciona en la presente descripción un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) que comprende cultivar una célula o célula huésped descrita en la presente descripción. En cierto aspecto, se proporciona en la presente descripción un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) que comprende expresar (por ejemplo, expresar recombinantemente) el anticuerpo mediante el uso de una célula o célula huésped descrita en la presente descripción (por ejemplo, una célula o un célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente descripción). En una modalidad particular, la célula es una célula aislada. En una modalidad particular, los polinucleótidos exógenos se introdujeron en la célula. En una modalidad particular, el método comprende, además, la etapa de purificar el anticuerpo obtenido de la célula o célula huésped.

Los métodos para producir anticuerpos policlonales se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, el Capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5a Ed., Ausubel FM y otros, eds., John Wiley and Sons, Nueva York).

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el uso de una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes, y presentación en fagos, o una combinación de estas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante el uso de técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la técnica y que se enseñan, por ejemplo, en Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling GJ y otros, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y, 1981). El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente descripción no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse de forma recombinante a partir de células huésped que expresan exógenamente un anticuerpo descrito en la presente descripción, por ejemplo, la cadena ligera o la cadena pesada de tal anticuerpo.

En modalidades específicas, un “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente descripción, es un anticuerpo producido por una sola célula (por ejemplo, hibridoma o célula huésped que produce un anticuerpo recombinante), en donde el anticuerpo se une específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) según se determina, por ejemplo, por ELISA u otro ensayo de unión a antígeno o de unión competitiva conocido en la técnica o en los ejemplos proporcionados en la presente descripción. En modalidades particulares, un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo quimérico

o un anticuerpo humanizado. En ciertas modalidades, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monovalente o un anticuerpo multivalente (por ejemplo, bivalente). En modalidades particulares, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoespecífico o multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico). Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente descripción pueden, por ejemplo, prepararse mediante el método de hibridoma como se describe en Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495 o pueden, por ejemplo, aislarse de bibliotecas de fagos mediante el uso de las técnicas descritas en la presente descripción, por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados de esa manera se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, el Capítulo 11 en: *Protocolos breves en biología molecular*, (2002) 5ª Ed., Ausubel FM y otros, *supra*).

Los métodos para producir y seleccionar anticuerpos específicos mediante el uso de la tecnología de hibridoma son rutinarios y se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, en el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, como una oveja, cabra, conejo, rata, hámster o mono macaco, se inmuniza para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína (por ejemplo, ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana)) usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después los linfocitos se fusionan con células de mieloma mediante el uso de un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Adicionalmente, puede usarse una técnica de RIMMS (inmunización repetitiva en múltiples sitios) para inmunizar a un animal (Kilpatrick KE y otros, (1997) *Hybridoma* 16: 381-9, incorporado en su totalidad como referencia).

En algunas modalidades, los ratones (u otros animales, como ratas, monos, burros, cerdos, ovejas, hámster, o perros) pueden inmunizarse con un antígeno (por ejemplo, ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana)) y una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se recolecta el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas que se conocen bien para cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles a partir de la American Type Culture Collection (ATCC®) (Manassas, VA), para formar hibridomas. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. En ciertas modalidades, los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados se recolectan y se fusionan con células de mieloma NS0. Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo

adecuado que contiene, preferentemente, una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento deficiente de células deficientes de HGPRT.

Modalidades específicas emplean células de mieloma que se fusionan eficientemente, apoyan la producción estable de anticuerpos de alto nivel por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas líneas celulares de mieloma se encuentran las líneas de mieloma murino, tales como la línea celular NS0 o las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, EE. UU., y células SP-2 o X63 -Ag8.653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE. UU. Se describieron, además, las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano también para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur y otros, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51- 63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándar (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI 1640. En adición, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o

cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen fragmentos de anticuerpos que reconocen una ApoC3 específica (por ejemplo, ApoC3 humana) y pueden generarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ descritos en la presente descripción pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, mediante el uso de enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Un fragmento Fab corresponde a uno de los dos brazos idénticos de una molécula de anticuerpo y contiene la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada. El fragmento $F(ab')_2$ contiene los dos brazos de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo unidos por enlaces disulfuro en la región bisagra.

Además, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden generarse, además, mediante el uso de diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan en la superficie de las partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombina junto con un enlazador de scFv por PCR y se clona en un vector fagémido. El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con un fago auxiliar. Los fagos usados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y M13, y los dominios VH y VL generalmente se fusionan de manera recombinante con el gen III del fago o el gen VIII. Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno particular pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, mediante el uso de antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen los descritos en Brinkman U y otros, (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS y otros, (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA y otros, (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L y otros, (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR y Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; solicitud del PCT núm. PCT/GB91/001134; publicaciones internacionales núm. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, y WO 97/13844; y las patentes de EE. UU. núm. 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 y 5,969,108.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones de codificación de anticuerpos del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluidos anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, que incluyen células de mamífero, células de insectos, células vegetales, levaduras, y bacterias, por ejemplo, como se describe a continuación. Las técnicas para producir de manera recombinante fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden emplearse, además, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación del PCT núm. WO 92/22324; Mullinax RL y otros, (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H y otros, (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; y Better M y otros, (1988) *Science* 240: 1041-1043.

En ciertas modalidades, para generar anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción, y una secuencia flanqueadora para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias de VH o VL de un molde, por ejemplo, clones de scFv. Mediante la utilización de técnicas de clonación conocidas por los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de VH, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de VL, por ejemplo, regiones constantes kappa o lambda humanas. Los dominios VH y VL pueden clonarse, además, en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena ligera se cotransfectan después en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede contener una región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón o rata fusionado a una región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT y Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD y otros, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; y las patentes de EE. UU. núm. 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397, y 6,331,415.

Un anticuerpo humanizado es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, una inmunoglobulina murina). En modalidades particulares, un anticuerpo humanizado comprende, además, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo puede incluir, además, las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. Puede seleccionarse un anticuerpo humanizado de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Los anticuerpos humanizados pueden producirse mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (patente europea núm. EP 239400; publicación internacional núm. WO 91/09967; y patentes de EE. UU. núm. 5,225,539, 5,530,101, y 5,585,089), enchapado o revestimiento (patentes europeas núm. EP 592106 y EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM y otros, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; y Roguska MA y otros, (1994) *PNAS* 91: 969-973), intercambio de cadenas (patente de EE. UU. núm. 5,565,332), y técnicas descritas en, por ejemplo, la patente de EE. UU. núm. 6,407,213, patente de EE.UU. núm. 5,766,886, publicación internacional núm. WO 93/17105; Tan P y otros, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C y otros, (2000) *Protein Eng.* 13 (5): 353-60; Morea V y otros, (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M y otros, (1997) *J Biol Chem* 272 (16): 10678-84; Roguska MA y otros, (1996) *Protein Eng* 9 (10): 895 904; Couto JR y otros, (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Sup): 5973s-5977s; Couto JR y otros, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 y Pedersen JT y otros, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73. Ver, además, la publicación de la solicitud de EE. UU. núm. US 2005/0042664 A1 (24 de febrero de 2005), que se incorpora en su totalidad en la presente descripción como referencia.

Se describieron métodos para preparar multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núm. 7,951,917; 7,183,076; 8,227,577; 5,837,242; 5,989,830; 5,869,620; 6,132,992 y 8,586,713.

Los anticuerpos de dominio único, por ejemplo, anticuerpos que carecen de las cadenas ligeras, pueden producirse por métodos que se conocen bien en la técnica. Ver Riechmann L y Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD y otros, (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1 (3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74 (4): 277-302; patente de EE. UU. núm. 6,005,079; y las publicaciones internacionales núm. WO

94/04678, WO 94/25591 y WO 01/44301.

Además, los anticuerpos que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos antiidiotipo que “imitan” un antígeno mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. (Ver, por ejemplo, Greenspan NS y Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; y Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438).

En modalidades particulares, un anticuerpo descrito en la presente descripción, que se une al mismo epítipo de ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) que un anticuerpo anti-ApoC3 descrito en la presente descripción, es un anticuerpo humano. En modalidades particulares, un anticuerpo descrito en la presente descripción, que bloquea competitivamente (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente descripción, de la unión a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana), es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. En particular, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón en adición a los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales separadamente o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región J_H evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para producir descendencia homocigota que expresa anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un antígeno (por ejemplo, ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana)). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de ratones transgénicos, inmunizados mediante el uso de tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Así, mediante el uso de tal técnica, es posible

producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, ver Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13: 65-93. Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, ver, por ejemplo, las publicaciones internacionales núm. WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las patentes de EE. UU. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 y 5,939,598. Los ejemplos de ratones capaces de producir anticuerpos humanos incluyen Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; patentes de EE. UU. núm. 6,075,181 y 6,150,184), HuAb-Mouse™ (Mederex, Inc./Gen Pharm; patentes de EE. UU. núm. 5,545,806 y 5,569,825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) y KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Los anticuerpos humanos que se unen específicamente a ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluidos los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Ver, además, las patentes de EE. UU. Núm. 4,444,887, 4,716,111, y 5,885,793; y las publicaciones internacionales núm. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, y WO 91/10741. En algunas modalidades, los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de hibridomas ratón-humano. Por ejemplo, los linfocitos de sangre periférica humana transformados con el virus de Epstein-Barr (EBV) pueden fusionarse con células de mieloma de ratón para producir hibridomas humano-ratón que secretan anticuerpos monoclonales humanos, y estos hibridomas humano-ratón pueden seleccionarse para determinar cuáles secretan anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a un antígeno objetivo (por ejemplo, ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana)). Tales métodos son conocidos y se describen en la técnica, ver, por ejemplo, Shinmoto H y otros, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y y otros, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31.

6. Kits

Se proporcionan, además, kits que comprenden uno o más anticuerpos descritos en la presente descripción, o composición farmacéutica o conjugados de estos. En una modalidad específica, se proporciona en la presente descripción un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción, tales como uno o más anticuerpos proporcionados en la presente descripción. En

algunas modalidades, los kits contienen una composición farmacéutica descrita en la presente descripción y cualquier agente profiláctico o terapéutico, tales como los descritos en la presente descripción. Opcionalmente asociado con tal(es) contenedor(es) puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

Se proporcionan, además, kits que pueden usarse en los métodos anteriores. En una modalidad, un kit comprende un anticuerpo descrito en la presente descripción, preferentemente, un anticuerpo purificado, en uno o más recipientes. En una modalidad específica, los kits descritos en la presente descripción contienen un antígeno ApoC3 sustancialmente aislado (por ejemplo, ApoC3 humana) como un control. En otra modalidad específica, los kits descritos en la presente descripción comprenden, además, un anticuerpo de control que no reacciona con un antígeno ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). En otra modalidad específica, los kits descritos en la presente descripción contienen uno o más elementos para detectar la unión de un anticuerpo al antígeno ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) (por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radioactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable). En modalidades específicas, un kit proporcionado en la presente descripción puede incluir un antígeno ApoC3 producido recombinantemente o sintetizado químicamente (por ejemplo, ApoC3 humana). El antígeno ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) proporcionado en el kit puede unirse, además, a un soporte sólido. En una modalidad más específica, los medios de detección del kit descrito anteriormente incluyen un soporte sólido al que se une un antígeno ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana). Tal un kit puede incluir, además, un anticuerpo antiratón/rata o anticuerpo antihumano marcado con indicador no unido. En esta modalidad, la unión del anticuerpo al antígeno ApoC3 (por ejemplo, ApoC3 humana) puede detectarse mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con indicador.

EJEMPLOS

El clon de anticuerpo previamente identificado, 5E5, se une a ApoC3 con alta afinidad a pH 7.4 y afinidad ligeramente reducida a pH 5.5 (ver la solicitud provisional de EE.UU. 62/360,084). La presente descripción proporciona nuevos derivados del clon 5E5 que exhiben una unión de alta afinidad a ApoC3 a pH 7.4, pero una afinidad muy reducida a

ApoC3 a pH 5.5 en relación a 5E5. Los siguientes ejemplos describen la caracterización de los nuevos derivados de 5E5. Las secuencias de aminoácidos de 5E5 se exponen en la solicitud provisional de EE. UU. núm. 62/360,084, y las secuencias de aminoácidos de los nuevos derivados de 5E5 se exponen en las Tablas 1-7, en la presente descripción.

Los ejemplos en esta sección se proporcionan para aclarar aún más las ventajas y características de la presente solicitud, pero no pretenden limitar el alcance de la aplicación. Los ejemplos son solo para fines ilustrativos.

Ejemplo 1: Caracterización in vitro de anticuerpos scFv-Fc anti-ApoC3.

Este ejemplo describe experimentos basados en resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar la cinética de unión al antígeno, tanto a pH 7.4 como a pH 5.5, de anticuerpos scFv-Fc anti-ApoC3.

Se generó un panel de nuevos derivados del anticuerpo clon 5E5 mediante la sustitución de uno o más aminoácidos de la CDR en la VH y/o VL de 5E5 con histidina. La cinética de unión al antígeno, tanto a pH 7.4 como a pH 5.5, de cada derivado de 5E5 se evaluó mediante el uso del método basado en SPR que se establece a continuación, y los clones que exhiben una unión de alta afinidad a ApoC3 a pH 7.4, pero una afinidad muy reducida a ApoC3 a pH 5.5 en relación con 5E5 se seleccionaron para caracterización adicional. La cinética de unión de los derivados de 5E5 ejemplares 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT, y 5E5VHWT_VL8 se establecen en la Tabla 14.

Los anticuerpos de prueba se produjeron a partir de células HEK293 transfectadas en cultivos a pequeña escala de 50 ml y se purificaron mediante cromatografía de proteína A mediante el uso del sistema de cromatografía ÄKTA Pure. La calidad y rendimientos de los fragmentos de anticuerpos purificados se determinaron por espectrofotometría y por SDS-PAGE.

Se empleó un método basado en SPR, en el que la ApoC3 humana biotinilada se capturó en un chip recubierto con estreptavidina (SA), y la cinética de unión de los anticuerpos de prueba al chip recubierto se midió a pH 7.4 y pH 5.5. Brevemente, se inyectaron 20 µl de ApoC3 humana biotinilada a una concentración de 10 µg/ml para alcanzar una densidad superficial de aproximadamente 500 RU. Se diluyeron 60 µl de cada anticuerpo de prueba en tampón HBS-EP (GE, núm. de cat. BR-1008-26; HEPES 0.010 M, NaCl 0.150M, EDTA 3mM, surfactante P20 0.05 % (v/v), pH 7.4) y se inyectaron a una concentración de 1-100 nM. Los anticuerpos de prueba se pasaron a través de las celdas de flujo a una velocidad de flujo de 30 µl/min, seguido de un lavado de disociación a pH 7.4 o pH 5.5 por 5 minutos. Los sensorgramas resultantes se

analizaron mediante el uso del software BIAevaluation 4.1 mediante la aplicación del modelo de unión 1:1 de Langmuir para derivar la cinética de unión. Los datos se ajustaron a cero y se sustrajeron los sensorgramas de las celdas de referencia.

Tabla 14. Cinética de unión de los anticuerpos scFv-Fc anti-ApoC3 a pH 7.4 y pH 5.5

Anticuerpo	Velocidad de asociación		Velocidad de disociación		Afinidad		
	ka (1/Ms) pH 7.4	ka (1/Ms) pH 5.5	kd (1/s) pH 7.4	kd (1/s) pH 5.5	K _D (nM) pH 7.4	K _D (nM) pH 5.5	K _D pH 5.5/ K _D pH 7.4
5E5WT	8.23E+05	3.93E+05	1.75E-05	2.53E-05	0.02	0.06	3.0
5E5VH5_V LWT	1.78E+05	1.47E+05	1.05E-04	1.60E-03	0.59	10.90	18.5
5E5VH12_ VLWT	3.08E+05	1.29E+05	1.57E-04	2.06E-03	0.51	16.00	31.4
5E5VHWT_ VL8	3.81E+05	2.69E+05	2.21E-04	1.16E-03	0.58	4.29	7.4

Todos los anticuerpos scFv-Fc probados mostraron una mayor afinidad por ApoC3 a pH 7.4 que a pH 5.5, con el anticuerpo 5E5VH12_VLWT que muestra la unión dependiente del pH más pronunciada (ver Tabla 14). La magnitud de la unión dependiente del pH se correlacionó positivamente con la tasa de disociación en condiciones ácidas.

Ejemplo 2: Caracterización in vitro de anticuerpos IgG1 humanos anti-ApoC3.

Basado en los resultados del Ejemplo 1, se generaron los anticuerpos scFv-Fc de prueba como anticuerpos IgG₁ humanos. Se empleó un ensayo basado en SPR, en el que la proteína ApoC3 humana se inmovilizó en un chip CM5, y la cinética de unión de los anticuerpos de prueba al chip recubierto se midió tanto a pH 7.4 como a pH 5.5. Brevemente, se preparó una solución de 50 µg/ml de ApoC3 humana nativa en tampón de acetato 10 mM a pH 4.5 y se inyectó hasta que la densidad superficial alcanzó aproximadamente 500 RU. Se diluyeron 60 µl de cada anticuerpo de prueba en tampón HBS-EP (GE, núm. de cat. BR-1008-26; HEPES 0.010 M, NaCl 0.150 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 0.05 % (v/v), pH 7.4) y se inyectó a una concentración como se describe en la Tabla 9. Los anticuerpos de prueba se pasaron a través de las celdas de flujo a una velocidad de flujo de 30 µl/min, seguido de un lavado de disociación a pH 7.4 o pH 5.5 por 5 minutos. Los sensorgramas resultantes se analizaron mediante el uso del software BIAevaluation 4.1 mediante la aplicación del modelo de unión 1:1 de Langmuir

para derivar la cinética de unión. Los datos se ajustaron a cero y se sustrajeron los sensorgramas de las celdas de referencia.

Tabla 15. Cinética de unión de anticuerpos IgG1 humanos anti ApoC3 a pH 7.4 y pH 5.5

Anticuerpo	pH	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmáx (RU)	Concentración	KD (M)
5E5WT	7.4	3.50E+05	1.79E-05	475	50-0.8 nM	5.12E-11
	5.5	3.40E+05	1.70E-05	519	50-0.8 nM	4.99E-11
5E5VH5_VLWT	7.4	1.78E+05	3.77E-05	347	50-0.8 nM	2.11E-10
	5.5	1.55E+05	2.03E-04	313	50-0.8 nM	1.31E-09
5E5VH12_VLWT	7.4	3.93E+05	1.38E-05	420	50-0.8 nM	3.51E-11
	5.5	3.66E+05	3.74E-04	413	50-0.8 nM	1.02E-09
5E5VHWT_VL8	7.4	7.82E+05	2.84E-05	479	25-0.8 nM	3.63E-11
	5.5	7.31E+05	4.06E-05	463	25-0.8 nM	5.56E-11
5E5VH5_VL8	7.4	1.77E+05	1.73E-04	309	50-0.8 nM	9.75E-10
	5.5	2.11E+05	2.42E-03	183	50-0.8 nM	1.14E-08
5E5VH12_VL8	7.4	2.67E+05	1.63E-04	291	50-0.8 nM	6.09E-10
	5.5	1.88E+05	1.65E-03	523	50-0.8 nM	8.79E-09
5E5VH5VH12_VLWT	7.4	6.16E+04	3.05E-04	220	50-0.8 nM	4.96E-09
	5.5	1.56E+05	3.16E-03	381	50-0.8 nM	2.02E-08
5E5VH5VH12_VL8	7.4	1.25E+05	2.80E-03	702	50-0.8 nM	2.24E-08
	5.5	No se detectó ninguna unión				

Todos los anticuerpos probados se unieron a ApoC3 humana a pH 7.4 y tuvieron una afinidad reducida por ApoC3 a pH 5.5 (ver la Tabla 15). 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT, 5E5VH5_VL8 y 5E5VH12_VL8 muestran una dependencia del pH particularmente pronunciada.

Ejemplo 3: Efecto de los anticuerpos anti-ApoC3 en la absorción de VLDL en los hepatocitos.

En este ejemplo, se determinó la capacidad de los anticuerpos anti-ApoC3 para atenuar la absorción de VLDL en los hepatocitos.

Brevemente, las células HepG2 (ATCC HB-8065) se cultivaron en una superficie recubierta de poli-d-lisina en medio mínimo esencial (MEM) completo suplementado con FCS al 10 % durante 24 horas, y en MEM completo suplementado con albúmina de suero bovino al 0.0125 % (Medio MEM-BSA) por otras 24 horas. Las células se

preincubaron con proteína ApoC3 humana 3 μ M (Athens Research and Technology) y 3 μ M de un anticuerpo de prueba en formato IgG₁ por 15 minutos en medio MEM-BSA fresco, y se adicionaron 30 μ g/ml de VLDL marcada con Dil sin ApoC3 (Kalen Biomedical, LLC núm. 770130-9) al medio. Después de una incubación de 4 horas, las células se incubaron adicionalmente con MEM completo fresco suplementado con un intralípido al 1 % por 20 minutos. La cantidad de VLDL marcada con Dil absorbida por las células se determinó mediante la lisis de las células con isopropanol a temperatura ambiente por 15 minutos, y la medida de la fluorescencia del marcador Dil en el lisado (ex=520 nm; em=580), mediante el cálculo de la cantidad de VLDL marcada con Dil mediante el uso de una curva estándar, y la normalización de los datos en función de la cantidad de proteína total en el lisado. Los datos se graficaron mediante el uso de GraphPad Prism 6 y se informan como promedio $\pm$ SEM. Se calcularon ANOVA unidireccionales con comparaciones múltiples mediante el uso de GraphPad Prism 6. Como se muestra en las Figuras 1A, 1B, y 1C, los anticuerpos 5E5WT, 5E5VHWT_VL8, 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT, y 5E5VH5_VL8 aumentaron la absorción de VLDL por las células HepG2. En particular, los anticuerpos 5E5VHWT_VL8, 5E5VH5_VLWT, 5E5VH12_VLWT, y 5E5VH5_VL8 restauraron completamente la absorción de VLDL en presencia de ApoC3.

Ejemplo 4: farmacocinética y farmacodinámica de anticuerpos anti-ApoC3.

Este ejemplo describe la caracterización *in vivo* del anticuerpo 5E5VH5_VL8 mediante el uso de un modelo de ratón que tiene una eliminación de triglicéridos deteriorada debido a la expresión transgénica de ApoC3 humana.

4.1 Generación de modelo de ratón

Ratones machos de tipo salvaje C57BL/6 de 60-63 días mantenidos con una dieta de alimentación estándar se infectaron con 3×10^{11} partículas virales de un vector AAV8 que albergaba un gen de ApoC3 humana unido operablemente a un promotor de la globulina de unión a la tiroxina (TBG) (RegenXBio) por administración intraperitoneal. Doce días después de la administración, se recolectaron muestras de sangre del seno retroorbital, y los niveles de ApoC3 humana en las muestras de sangre se midieron por ELISA mediante el uso de un anticuerpo anti-ApoC3 primario (policlonal de conejo anti-ApoC3 humana de Abcam núm. ab21032) y un anticuerpo de ApoC3 secundario (policlonal de cabra de ApoC3 conjugado a biotina de Abcam núm. ab21024). En los ratones infectados, el nivel medio en suero de ApoC3 humana fue de 9.9 μ M. El nivel medio de triglicéridos circulantes después de un ayuno de cuatro horas fue de 163 mg/dL en estos ratones, mientras que el nivel medio de triglicéridos circulantes en

ratones de control fue de 109 mg/dL ($p = 0.0065$).

Después los ratones se agruparon de manera que todos los grupos tuvieran niveles medios de ApoC3 similares en el día 12. Catorce días después de la infección con AAV, se recolectaron muestras de sangre del seno retroorbital para establecer los niveles de ApoC3 basales ($T=0$). 25 mg/kg de un anticuerpo IgG₁ humano anti- ApoC3 de prueba se administró a cada ratón mediante inyección en el espacio subcutáneo dorsal. Un anticuerpo IgG₁ humano antilisosoma de huevo de gallina (HyHEL5) se usó como un control de isotipo. Se recolectaron muestras de sangre del seno retroorbital 0, 2, 4, 8, y 24 horas después de la administración de los anticuerpos de prueba, y aproximadamente cada 2 días después por 30 días. Todos los estudios en animales se llevaron a cabo de acuerdo con las recomendaciones de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Institutes of Health. Todos los procedimientos se aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee de Vascumab, LLC.

4.2 Farmacocinética de anticuerpos anti-ApoC3

Los ratones que expresan ApoC3 humana se generaron y trataron como se describe en la Sección 4.1. Los niveles plasmáticos de los anticuerpos IgG₁ humanos se determinaron con un ensayo ELISA. Específicamente, una placa de 96 pocillos (Griener núm. 655061) se recubrió durante una noche a 4 °C con 50 µL de anticuerpo IgG primario (Fitzgerald policlonal IgG Fc antihumano de cabra 41-XG57) diluido en PBS. La placa se lavó 4 veces con 200 µL de TBS-T, y se bloqueó con 200 µL de tampón de bloqueo que consiste en 3 % de BSA (fracción V de BSA sin proteasas de Roche núm. 03 117 332 001) más leche limpia (Pierce bloqueador de leche limpia núm. 37587) en PBS por 90 minutos a 30 °C. Se retiró el tampón de bloqueo, y se adicionaron 50 µL de muestra de prueba diluida en tampón de bloqueo y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con rotación a 300 rpm. La placa se lavó cuatro veces con 200 µL de TBS-T, y se adicionaron 50 µL de anticuerpo secundario (policlonal (biotina) anti IgG-Fc humana de cabra de Abcam núm. ab97223) diluido en tampón de bloqueo y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente con rotación a 300 rpm. La placa se lavó una vez con TBS-T, y se adicionaron 50 µL de SA-HRP (Abcam núm. 64269) diluido 100 veces en PBS y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente con rotación a 300 rpm. La placa se lavó 4 veces con 200 µL de TBS-T, y se desarrolló con 80 µL de TMB. La reacción cromogénica se terminó con 50 µL de HCl 0.5 N. La absorbancia se leyó a la longitud de onda de 450 nm. Las cantidades de IgG humana en los pocillos de prueba se calcularon a partir de un ajuste de 4 parámetros de una curva estándar (dispositivos moleculares) construida mediante el uso del anticuerpo de

prueba purificado. Este método detecta específicamente ApoC3 humana, y no reacciona de forma cruzada con ApoC3 de ratón.

Como se muestra en la Figura 2A, el anticuerpo 5E5 se degradó rápidamente en ratones que expresaban ApoC3 humana. Esto puede explicarse por el rápido recambio de ApoC3 a través de la absorción de partículas de lípidos que contienen ApoC3. El anticuerpo 5E5VH5_VL8, que tiene una afinidad reducida a ApoC3 a un pH más bajo, puede disociarse de ApoC3 en orgánulos ácidos y regresar al torrente sanguíneo a través del reciclaje endosómico. La vida media de 5E5VH5_VL8 es de aproximadamente una semana, que es similar a la vida media del anticuerpo de control de isotipo HyHel5 (un anticuerpo que no se une a un antígeno específico en ratones). El nivel plasmático de 5E5VH5_VL8 volvió a la línea de base aproximadamente un mes después de la inyección. La vida media extendida de 5E5VH5_VL8 hace que este anticuerpo sea un excelente candidato para la aplicación clínica, debido a la baja frecuencia de administración requerida para mantener un nivel terapéutico del anticuerpo en suero.

4.3 Farmacodinámica de los anticuerpos anti-ApoC3

Los ratones que expresan ApoC3 humana se generaron y trataron como se describe en la Sección 4.1. Los niveles plasmáticos de ApoC3 y ApoB humanas se determinaron con un ensayo ELISA. Específicamente, una placa de 96 pocillos (Griener núm. 655061) se recubrió durante la noche a 4 °C con 50 µL de anticuerpo de ApoC3 primario (policlonal anti-ApoC3 humana de conejo de Abcam núm. ab21032) o 50 µL de anticuerpo de ApoB primario (policlonal anti ApoB humana de cabra de Meridian Life Sciences núm. K45253G) diluido en PBS. La placa se lavó 4 veces con 200 µL de TBS-T, y se bloqueó con 200 µL de tampón de bloqueo (Pierce Clear Milk Blocker núm. 37587 en PBS) por 90 minutos a 30 °C. Se retiró el tampón de bloqueo, y se adicionaron 50 µl de muestra de prueba diluida en tampón de bloqueo y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente con rotación a 300 rpm. La placa se lavó cuatro veces con 200 µL de TBS-T y 50 µL de anticuerpo de ApoC3 secundario (policlonal de cabra de ApoC3 conjugado de biotina núm. ab21024) o anticuerpo ApoB secundario (policlonal de cabra de ApoB48/100 conjugado a biotina de Meridian Life Sciences núm. 34003G) diluido en tampón de bloqueo se adicionó y se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente con rotación a 300 rpm. La placa se lavó una vez con TBS-T, y se adicionaron 50 µL de SA-HRP (Abcam núm. 64269) diluido 100 veces en PBS y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente con rotación a 300 rpm. La placa se lavó 4 veces con 200 µL de TBS-T, y se desarrolló con 80 µL de TMB (Thermo Ultra-TMB ELISA núm.

34028) seguido de 50 µL de 0.5 N HCL. La absorbancia se leyó a 450 nm. La cantidad de ApoC3 en los pocillos de prueba se calculó a partir de un ajuste de 4 parámetros de una curva estándar (dispositivos moleculares) construida mediante el uso de ApoC3 purificada (Athens Research and Technology). La cantidad de ApoB en los pocillos de prueba se calculó a partir de un ajuste de 4 parámetros de una curva estándar (Molecular Devices) construida mediante el uso de VLDL de ratón aisladas por centrifugación (se supone que el contenido de ApoB es el 20 % del contenido de proteína total). Los datos se calcularon y se representaron como valores porcentuales en relación con los niveles correspondientes en ratones tratados con el anticuerpo de control HyHel5.

Como se muestra en las Figuras 2B y 2C, el anticuerpo 5E5 redujo los niveles plasmáticos de ApoC3 y ApoB humanas inicialmente, pero los niveles volvieron a la normalidad después de aproximadamente 2 días. Por el contrario, 5E5VH5_VL8 redujo los niveles plasmáticos de ApoC3 y ApoB humanas durante aproximadamente un mes. Esta larga duración de la eficacia fue consistente con la larga vida media de 5E5VH5_VL8, y confirmó que 5E5VH5_VL8 sería un excelente candidato clínico.

Ejemplo 5: Humanización de anticuerpos anti-ApoC3

Se generaron variantes humanizadas de 5E5VH5_VL8 de acuerdo con los métodos de “a partir de línea germinal” descritos en el documento núm. WO2012123586A1. Brevemente, se identificaron segmentos de genes de línea germinal humana con la misma estructura de pliegue canónico y la mayor identidad de secuencia de aminoácidos para las regiones VH y VL de 5E5VH5_VL8 en comparación con secuencias de genes de línea germinal humana conocidas. Las secuencias de la línea germinal de la cadena pesada y ligera humana más cercanas fueron IGHV3-23*01 humana e IGKV2-28*01 humana, respectivamente. Se construyó una biblioteca de Fab de presentación en fagos de variantes 5E5VH5_VL8 que incorporaba mutaciones humanizantes en los residuos aminoacídicos de 5E5VH5_VL8 que difieren de las secuencias de línea germinal IGHV3-23*01 humana e IGKV2-28*01 humana, con residuos los residuos de llama y humanos en cada posición objetivo que están igualmente representados en la biblioteca. Las mutaciones para eliminar los restos pasivos de secuencia DG, DS, NR, o M se incorporaron, además, a la biblioteca. Se identificaron variantes de 5E5VH5_VL8 humanizadas con las mejores características de unión al objetivo (por ejemplo, unión de alta afinidad a ApoC3 a pH 7.4, pero afinidad muy reducida con ApoC3 a pH 5.5) después de varias rondas de selecciones de presentación de fagos conducidas por afinidad.

Se identificaron veinte anticuerpos anti-ApoC3 humanizados que retuvieron una unión

dependiente del pH, de alta afinidad a partir de la selección inicial y la detección descritas anteriormente. Las secuencias codificantes para VH y VK de estos anticuerpos se clonaron en un vector de expresión, y se produjeron en las células ExpiCHO-S como moléculas IgG₁ de longitud completa. Después, los anticuerpos se purificaron mediante el uso de la columna Hitrap MabSelect Sure (GE, núm. de cat. 11-0034-94) en un sistema ÄKTA Pure. Los anticuerpos se eluyeron mediante el uso de 1.0 ml de tampón citrato 0.1 M a pH 3.0, y las fracciones eluidas se recolectaron en tubos que contienen 0.1 ml de Tris-HCl pH 9.0 para neutralización. Las fracciones que contenían anticuerpos se agruparon y desalaron en solución salina tamponada con fosfato 1 x (PBS; NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 15 mM, pH7.4) mediante el uso de una columna de desalación HiTrap en el sistema ÄKTA Pure. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante la medida de la absorbancia a 280 nm y la corrección con el coeficiente de extinción de la siguiente manera: $(A_{280nm}-A_{340nm})/\epsilon$ (coeficiente de extinción en g/L). Las muestras purificadas se examinaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para confirmar el tamaño y la pureza correctos de las muestras.

Se realizaron dos ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR) diferentes para evaluar los parámetros de asociación y disociación dependientes del pH de los anticuerpos anti-ApoC3 humanizados. Los métodos y resultados de los dos ensayos se describen a continuación.

5.1 Análisis de SPR de la unión del anticuerpo anti-ApoC3 humanizado a ApoC3 inmovilizada

La ApoC3 humana nativa biotinilada se capturó en un chip SPR recubierto con estreptavidina (GE Healthcare, núm. de cat. BR100032) a pH 7.4, de acuerdo con el método proporcionado por Biacore, mediante inyección de 20 µl de ApoC3 humana biotinilada 10 µg/ml que alcanzó la densidad superficial de aproximadamente 500 RU. 60 µL de anticuerpo de prueba en un intervalo de 1-50 nM diluido en tampón HBS-EP (GE, núm. de cat. BR-1008-26; HEPES 0.010 M, NaCl 0.150M, EDTA 3 mM, surfactante P20 0.05% (v/v) pH 7.4) se inyectó y se pasó a través de las celdas de flujo a una velocidad de flujo de 30 µl/min, seguido de un lavado de disociación a pH 7.4 por 5 min. Después de la disociación, las superficies de las celdas de flujo se regeneraron mediante la inyección de 10 µl de NaOH 10 mM/NaCl 1 M y 10 µl de glicina 10 mM a pH 1.5. El ensayo se repitió a pH 5.5 mediante el uso del mismo protocolo general, donde el tampón de dilución de muestra y de análisis se reemplazó por un tampón HBS-EP suplementado con tampón citrato a una concentración final de 10 mM y el pH se ajustó

a 5.5.

Los sensorgramas resultantes se analizaron mediante el uso del software BIAevaluation 4.1 mediante el uso del modelo de unión 1:1 de Langmuir para derivar la cinética de unión. Los datos se ajustaron a cero y se sustrajeron los sensorgramas de las celdas de referencia. Los sensorgramas se referenciaron dos veces al ensayo en blanco sin analito. Los parámetros ajustados se consideraron no aplicables si los valores de disociación estaban por debajo del límite de detección del equipo de k_d : 1×10^{-6} 1/s.

En la Tabla 16 se presenta una descripción general de los parámetros cinéticos calculados para los anticuerpos humanizados generados. La Figura 3 muestra los sensorgramas superpuestos para cada mAb humanizado generado a los dos valores de pH del ensayo, a concentraciones uniformes de 25 nM de mAb.

Tabla 16. Análisis de SPR de la unión del anticuerpo ApoC3 humanizado a ApoC3 inmovilizada

Anticuerpo	HBS-EP	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmáx (RU)	Conc de analito	KA (1/M)	KD (M)	KD (nM)	KD pH5.5/KD pH7.4
5E5	pH7.4	3.50E+05	1.79E-05	475	50nM-0.8 nM	1.95E+10	5.12E-11	0.05	0.97
	pH5.5	3.40E+05	1.70E-05	519	50nM-0.8 nM	2.01E+10	4.99E-11	0.05	
5E5VH5_VL8	pH7.4	1.77E+05	1.73E-04	309	50nM-0.8 nM	1.03E+09	9.75E-10	0.98	11.7
	pH5.5	2.11E+05	2.42E-03	183	50nM-0.8 nM	8.74E+07	1.14E-08	11.40	
5E5VH12	pH7.4	6.56E+05	1.12E-05	598	25nM-0.8 nM	5.84E+10	1.71E-11	0.02	27.6
	pH5.5	3.02E+05	1.43E-04	684	50nM-0.8 nM	2.12E+09	4.72E-10	0.47	
mAb1	pH7.4	2.61E+05	1.18E-05	692	50nM-0.8 nM	2.20E+10	4.54E-11	0.05	5.22
	pH5.5	4.40E+05	1.04E-04	669	25nM-0.8 nM	4.23E+09	2.37E-10	0.24	
mAb2	pH7.4	2.45E+05	1.35E-05	696	50nM-0.8 nM	1.81E+10	5.52E-11	0.06	5.13
	pH5.5	4.35E+05	1.23E-04	668	25nM-0.8 nM	3.54E+09	2.83E-10	0.28	
mAb3	pH 7.4	2.12E+05	2.33E-05	697	50nM-0.8 nM	9.11E+09	1.10E-10	0.11	3.19
	pH5.5	3.63E+05	1.27E-04	673	25nM-0.8 nM	2.85E+09	3.51E-10	0.35	
mAb4	pH 7.4	2.43E+05	1.13E-06	671	50nM-0.8 nM	2.15E+11	4.64E-12	n.a.	n.a.
	pH5.5	4.16E+05	1.56E-04	648	25nM-0.8 nM	2.67E+09	3.74E-10	0.37	
mAb5	pH 7.4	2.37E+05	3.51E-05	668	50nM-0.8 nM	6.76E+09	1.48E-10	0.15	2.33
	pH5.5	4.19E+05	1.45E-04	628	25nM-0.8 nM	2.90E+09	3.45E-10	0.35	
mAb6	pH 7.4	2.22E+05	1.33E-05	680	50nM-0.8 nM	1.67E+10	5.99E-11	0.06	5.79
	pH5.5	4.25E+05	1.48E-04	608	25nM-0.8 nM	2.88E+09	3.47E-10	0.35	
mAb7	pH 7.4	3.64E+05	3.37E-05	773	50nM-0.8 nM	1.08E+10	9.28E-11	0.09	52.7
	pH5.5	6.56E+05	3.21E-03	523	25nM-0.8 nM	2.05E+08	4.89E-09	4.89	
mAb8	pH 7.4	2.37E+05	2.41E-05	537	50nM-0.8 nM	9.83E+09	1.02E-10	0.10	7.34
	pH5.5	4.90E+05	3.67E-04	558	25nM-0.8 nM	1.34E+09	7.49E-10	0.75	

mAb9	pH 7.4	2.23E+05	3.32E-05	548	50nM-0.8 nM	6.71E+09	1.49E-10	0.15	5.09
	pH5.5	4.86E+05	3.69E-04	566	25nM-0.8 nM	1.32E+09	7.59E-10	0.76	
mAb10	pH 7.4	2.21E+05	2.12E-05	617	50nM-0.8 nM	1.05E+10	9.56E-11	0.10	2.82
	pH5.5	4.17E+05	1.13E-04	557	25nM-0.8 nM	3.70E+09	2.70E-10	0.27	
mAb11	pH 7.4	2.19E+05	3.80E-05	612	50nM-0.8 nM	5.77E+09	1.73E-10	0.17	1.91
	pH5.5	4.45E+05	1.47E-04	555	25nM-0.8 nM	3.02E+09	3.31E-10	0.33	
mAb12	pH 7.4	2.28E+05	1.49E-05	635	50nM-0.8 nM	1.53E+10	6.55E-11	0.07	2.12
	pH5.5	4.83E+05	6.73E-05	530	25nM-0.8 nM	7.18E+09	1.39E-10	0.14	
mAb13	pH 7.4	1.10E+05	4.61E-04	447	50nM-0.8 nM	2.38E+08	4.19E-09	4.19	1.33
	pH5.5	4.79E+05	2.67E-03	164	25nM-0.8 nM	1.80E+08	5.56E-09	5.56	
mAb14	pH 7.4	1.44E+05	4.27E-04	423	50nM-0.8 nM	3.38E+08	2.96E-09	2.96	7.20
	pH5.5	3.70E+05	7.88E-03	115	25nM-0.8 nM	4.70E+07	2.13E-08	21.30	
mAb15	pH 7.4	5.16E+05	2.77E-06	951	50nM-0.8 nM	1.86E+11	5.38E-12	n.a.	n.a.
	pH5.5	7.05E+05	2.49E-04	753	25nM-0.8 nM	2.83E+09	3.53E-10	0.35	
mAb16	pH 7.4	5.46E+05	3.75E-04	813	50nM-0.8 nM	1.46E+09	6.87E-10	0.69	10.8
	pH5.5	1.63E+06	1.21E-02	282	25nM-0.8 nM	1.34E+08	7.44E-09	7.44	
mAb17	pH 7.4	5.03E+05	2.33E-05	891	50nM-0.8 nM	2.15E+10	4.64E-11	0.05	7.37
	pH5.5	8.06E+05	2.76E-04	746	25nM-0.8 nM	2.92E+09	3.42E-10	0.34	
mAb18	pH 7.4	6.28E+05	8.38E-04	721	50nM-0.8 nM	7.49E+08	1.33E-09	1.33	6.48
	pH5.5	1.79E+06	1.55E-02	179	25nM-0.8 nM	1.16E+08	8.62E-09	8.62	
mAb19	pH 7.4	6.40E+05	2.90E-05	774	25nM-0.8 nM	2.21E+10	4.53E-11	0.05	9.21
	pH5.5	7.10E+05	2.96E-04	736	25nM-0.8 nM	2.40E+09	4.17E-10	0.42	
mAb20	pH 7.4	8.31E+05	4.87E-04	649	25nM-0.8 nM	1.71E+09	5.86E-10	0.59	16.11
	pH5.5	2.27E+06	2.14E-02	202	25nM-0.8 nM	1.06E+08	9.44E-09	9.44	

* el ensayo a pH 7.4 dio como resultado una lectura de disociación por debajo del límite de detección del equipo

n.a. no aplicable

Como se muestra en la Figura 3, del mAb1 al mAb6 demostraron disociaciones muy bajas tanto a pH 7.4 como a pH 5.5. Su afinidad aparente a pH 5.5 mejoró en relación con 5E5VH5_VL8, y no se observó la unión al objetivo dependiente del pH. El anticuerpo mAb7 muestra una unión al objetivo dependiente del pH clara, con una alta disociación a pH 5.5. Sin embargo, los valores de $R_{\text{máx}}$ en la fase de unión a ambos valores de pH fueron más altos que los de 5E5VH5_VL8. Los anticuerpos del mAb8 al mAb12 demostraron disociaciones muy bajas a pH 7.4 y niveles de $R_{\text{máx}}$ más altos a pH 5.5 que a pH 7.4. Su afinidad aparente a pH 5.5 mejoró en relación con 5E5VH5_VL8, y no se observó la unión al objetivo dependiente del pH. Los anticuerpos mAb13 y mAb14 se generaron mediante el injerto de las secuencias de HCDR y LCDR en las secuencias marco de la línea germinal humana más cercanas, y mostraron características de unión al objetivo dependiente del pH claras. Sin embargo, su afinidad con ApoC3 humana se redujo a pH 7.4 en relación con 5E5VH5_VL8. Los anticuerpos mAb15, mAb17, y mAb19 no contenían el residuo de histidina en la LCDR3 (Q90H), pero mostraban las características deseadas de unión al objetivo dependiente del pH en la pantalla. Las secuencias de los anticuerpos mAb16, mAb18, y mAb20 eran idénticas a las de los mAb15, mAb17, y mAb19, respectivamente, excepto que el residuo correspondiente a H90 5E5VH5_VL8 era histidina. Como se muestra en la Figura 3, mAb16, mAb18, y mAb20 mostraron una clara unión al objetivo dependiente del pH, debido a la afinidad reducida al objetivo a pH 5.5 y al aumento de la disociación a pH 7.4.

5.2 Análisis de SPR de la unión de ApoC3 a anticuerpos anti-ApoC3 humanizados inmovilizados

Se diseñó un ensayo de SPR invertido en el que se capturó un anticuerpo de prueba en un chip SPR, se inyectó la proteína ApoC3 humana, y se midió la unión de ApoC3 al anticuerpo. Específicamente, el anticuerpo Fc γ específico anti IgG humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, núm. de cat. 109-005-098) se inmovilizó en una superficie de chip CM5 (GE Healthcare, núm. de cat. BR100012). La inmovilización se realizó de acuerdo con el método proporcionado por Biacore/GE mediante el uso del kit NHS/EDC (Biacore AB, cat.núm. BR-1000-50): después de la activación del chip, se preparó una solución de 30 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti Fc γ humano en tampón de acetato 10 mM con un pH de 5.0 y se inyectó hasta que la densidad de la superficie alcanzó aproximadamente 10000 RU. El ciclo analítico comprendió las siguientes etapas:

(1) captura de anticuerpos: inyección del anticuerpo a una concentración de 50 nM a pH 7.4 o pH 5.5 diluido en tampón HBS-EP (GE, núm. de cat. BR-1008-26; HEPES 0.010 M, NaCl 0.150 M, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.05 % (v/v), pH 7.4) y se permitió

- que se capturara por el anticuerpo anti huFcγ de alta afinidad hasta 800 RU;
- (2) estabilización de línea base: inyección de 100 µl de tampón HBS-EP a una velocidad de flujo de 30 µl/ml;
- (3) unión al objetivo: inyección de 60 µl de proteína ApoC3 objetivo diluida en tampón HBS-EP a concentraciones de 400 nM, 200 nM, 100 nM y 50 nM;
- (4) lavado de disociación: inyección de tampón HBS-EP a una velocidad de flujo de 30 µl/ml por 5 minutos para evaluar la fase de disociación;
- (5) regeneración del chip mediante la inyección de 20 µl de glicina 10 mM a pH 1.5.

Los sensorgramas resultantes se analizaron mediante el uso del software BIAevaluation 4.1 mediante el uso del modelo de unión 1:1 de Langmuir para derivar la cinética de unión. Los datos se ajustaron a cero, se sustrajeron los sensorgramas de las celdas de referencia y se usó el ensayo en blanco sin analito para hacer doble referencia a los sensorgramas correspondientes a las inyecciones de analito. Los sensorgramas de la fase de disociación y asociación se ajustaron por separado para las 4 curvas de concentración diferentes. Los sensorgramas se excluyeron del ajuste si los valores máximos de RU alcanzados estaban por debajo del límite de detección del equipo (<5 RU), Biacore 3000 (Biacore AB).

En la Tabla 17 se presenta una descripción general de los parámetros cinéticos calculados para los anticuerpos humanizados generados. La Figura 4 muestra las características de unión para las variantes generadas. La disociación de cada anticuerpo se incrementó en esta configuración, debido a la diferente presentación de la proteína objetivo.

Tabla 17. Análisis de SPR de la unión de ApoC3 a anticuerpos anti-ApoC3 humanizados, inmovilizados.

Anticuerpo	HBS-EP	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmáx (RU)	Conc de objetivo	KA (1/M)	KD (M)	KD (nM)	KD (nM) pH5.5/ pH7.4
5E5VH5_VL8	pH7.4	4.27E+04	1.27E-02	68.1	600 - 50 nM	3.35E+06	2.98E-07	298	n/a
	pH5.5	n/a	n/a	n/a	600 - 50 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb1	pH7.4	5.76E+04	4.26E-03	86.4	600 - 50 nM	1.35E+07	7.39E-08	74	3.42
	pH5.5	1.01E+05	2.57E-02	129	600 - 50 nM	3.95E+06	2.53E-07	253	
mAb2	pH7.4	4.45E+04	4.60E-03	86.3	600 - 50 nM	9.69E+06	1.03E-07	103	2.82
	pH5.5	9.66E+04	2.81E-02	124	600 - 50 nM	3.44E+06	2.90E-07	290	
mAb3	pH 7.4	3.34E+04	5.82E-03	90	600 - 50 nM	5.75E+06	1.74E-07	174	1.86
	pH5.5	1.02E+05	3.30E-02	105	600 - 50 nM	3.09E+06	3.23E-07	323	
mAb4	pH 7.4	4.55E+04	5.65E-03	71.7	600 - 50 nM	8.06E+06	1.24E-07	124	3.48
	pH5.5	8.31E+04	3.59E-02	117	600 - 50 nM	2.32E+06	4.32E-07	432	
mAb5	pH 7.4	3.51E+04	6.37E-03	75.3	600 - 50 nM	5.51E+06	1.81E-07	181	2.25
	pH5.5	9.20E+04	3.76E-02	49.2	600 - 50 nM	2.45E+06	4.08E-07	408	
mAb6	pH 7.4	4.09E+04	6.72E-03	67.8	600 - 50 nM *	6.08E+06	1.65E-07	165	5.22
	pH5.5	9.31E+04	8.02E-02	95.8	600 - 50 nM	1.16E+06	8.61E-07	861	
mAb7	pH 7.4	4.85E+04	1.20E-02	83.8	600 - 50 nM	4.05E+06	2.47E-07	247	2.36
	pH5.5	1.11E+05	6.46E-02	36.0	600 - 50 nM	1.71E+06	5.83E-07	583	
mAb8	pH 7.4	3.21E+04	7.72E-03	62.4	600 - 50 nM **	4.15E+06	2.41E-07	241	1.00
	pH5.5	8.46E+04	2.05E-02	99	600 - 100 nM	4.13E+06	2.42E-07	242	
mAb9	pH 7.4	2.88E+04	6.69E-03	69.8	600 - 50 nM	4.31E+06	2.32E-07	232	2.33
	pH5.5	8.63E+04	4.67E-02	96.4	600 - 50 nM	1.85E+06	5.41E-07	541	

mAb10	pH 7.4	3.19E+04	6.01E-03	64.1	600 - 50 nM **	5.30E+06	1.89E-07	189	1.77
	pH5.5	8.21E+04	2.74E-02	91.7	600 - 50 nM	2.99E+06	3.34E-07	334	
mAb11	pH 7.4	4.04E+04	5.23E-03	57.5	600 - 50 nM	7.73E+06	1.29E-07	129	3.90
	pH5.5	8.05E+04	4.05E-02	82.6	600 - 50 nM	1.99E+06	5.03E-07	503	
mAb12	pH 7.4	2.04E+04	6.55E-03	90.8	600 - 50 nM **	3.12E+06	3.21E-07	321	1.07
	pH5.5	7.32E+04	2.51E-02	99	600 - 50 nM	2.91E+06	3.43E-07	343	
mAb13	pH 7.4	3.70E+04	3.70E-02	28.5	600 - 50 nM	9.98E+05	1.00E-06	1000	n/a
	pH5.5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb14	pH 7.4	2.60E+04	4.58E-02	42.8	600 - 50 nM	5.67E+05	1.76E-06	1760	n/a
	pH5.5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb15	pH 7.4	1.09E+05	3.78E-03	64.5	600 - 50 nM **	2.88E+07	3.47E-08	35	2.48
	pH5.5	1.34E+05	1.16E-02	122	600 - 50 nM	1.16E+07	8.62E-08	86	
mAb16	pH 7.4	7.81E+04	4.66E-02	70.5	600 - 100 nM	1.68E+06	5.96E-07	596	n/a
	pH5.5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb17	pH 7.4	9.87E+04	6.16E-03	62.7	600 - 50 nM **	1.60E+07	6.24E-08	62	4.12
	pH5.5	8.45E+04	2.17E-02	118	600 - 50 nM	3.89E+06	2.57E-07	257	
mAb18	pH 7.4	1.06E+05	5.39E-02	38.4	600 - 50 nM	1.97E+06	5.09E-07	509	n/a
	pH5.5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	
mAb19	pH 7.4	1.30E+05	4.63E-03	70.3	600 - 50 nM	2.82E+07	3.55E-08	36	4.42
	pH5.5	1.27E+05	1.98E-02	103	600 - 50 nM	6.37E+06	1.57E-07	157	
mAb20	pH 7.4	5.51E+04	7.37E-02	98.9	600 - 50 nM	7.47E+05	1.34E-06	1340	n/a
	pH5.5	n/a	n/a	n/a	600 nM	n/a	n/a	n/a	

Los sensorgramas se restaron al canal en blanco y se referenciaron dos veces al ensayo en blanco sin analito.

n/a: no aplicable

* con excepción del sensorgrama de 400nM

Como se muestra en la Figura 4, del mAb1 al mAb6 mostraron una afinidad aparente mejorada por ApoC3 a pH 7.4, y se observó la unión al objetivo dependiente del pH. El anticuerpo mAb7 mostró una clara unión al objetivo dependiente del pH, con una alta disociación a ambos valores de pH. El valor $R_{\text{máx}}$ a pH 5.5 en la fase de asociación se incrementó en relación con 5E5VH5_VL8. Los anticuerpos del mAb8 al mAb12 demostraron disociaciones más bajas a pH 7.4 que 5E5VH5_VL8, niveles de $R_{\text{máx}}$ más altos a pH 5.5 que a pH 7.4, disociaciones más altas a pH 5.5 que las de 5E5VH5_VL8, y unión al objetivo dependiente del pH. Los anticuerpos mAb13 y mAb14 (generados mediante el injerto de las secuencias de HCDR y LCDR en las secuencias marco de la línea germinal humana más cercanas) mostraron pérdida de unión a ambos niveles de pH y, por lo tanto, no se calcularon los valores de afinidad a pH 5.5. Los anticuerpos mAb16, mAb18, y mAb20 mostraron una clara unión al objetivo dependiente del pH, debido a la afinidad reducida hacia el objetivo a un pH 5.5, sin embargo, sus disociaciones a un pH 7.4 también aumentaron.

En resumen, se identificaron los siguientes grupos de perfil de unión para los anticuerpos humanizados de acuerdo con los resultados del ensayo de SPR:

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

Grupo 2: mAbs 15, 17 y 19;

Grupo 3: mAb 16, 18 y 20;

El grupo 4 contenía mAb 7; y

Grupo 5: mAbs 13 y 14.

Dentro de cada grupo, todas las variantes mostraron un perfil de asociación y disociación de SPR similar. Por lo tanto, se seleccionó un anticuerpo representativo de cada grupo para evaluar su termotolerancia, como uno de sus parámetros de capacidad de desarrollo, en función de los criterios del mayor porcentaje de homología humana.

5.3 Caracterización de la termotolerancia de anticuerpos anti-ApoC3 humanizados seleccionados

La termotolerancia de los anticuerpos humanizados se evaluó después de la incubación a diferentes temperaturas en el intervalo de 56 a 68 °C por 1 h. La actividad de los anticuerpos se determinó en un ensayo de SPR en el que se inmovilizaron 500 RU de proteína huApoC3 nativa en un chip CM5 (GE Healthcare, núm. de cat. BR100012). La inmovilización se realizó de acuerdo con el método proporcionado por Biacore mediante el uso del kit NHS/EDC (Biacore AB): después de la activación del chip, se preparó una solución de 60 µg/ml de ApoC3 humana en tampón de acetato 10 mM a pH 4.5 y se inyectó hasta que la densidad superficial alcanzó aproximadamente 500 RU.

100 μ L de anticuerpo de prueba a 10 nM diluido en tampón HBS-EP (GE, cat núm. BR-1008-26; HEPES 0.010 M, NaCl 0.150 M, EDTA 3mM, surfactante P20 0.05 % (v/v), pH 7.4) se inyectó y pasó a través de las celdas de flujo a una velocidad de flujo de 30 μ L/min, seguido de un lavado de disociación con el tampón HBS-EP a pH 7.4 por 10 min. Después de la disociación, las superficies de las celdas de flujo se regeneraron mediante la inyección de 10 μ L de NaOH 10 mM/NaCl 1 M y 10 μ L de glicina 10 mM a pH 1.5.

La velocidad de asociación y el valor máximo de RU alcanzado en la fase de unión se midieron como el parámetro de lectura. La velocidad de asociación (pendiente) se evaluó en la fase de unión inicial hasta 200 s y el valor máximo de RU (R0) se leyó al comienzo de la fase de disociación a 345 s. El porcentaje de anticuerpos funcionales se calculó en base a la referencia (muestra incubada a 4 °C) establecida a 100 %. La temperatura de fusión de cada anticuerpo se determinó como el punto de inflexión en las curvas de actividad vs temperatura.

Como se muestra en las Figuras 5A y 5B, y como se enumera en la Tabla 18, la mayoría de los anticuerpos humanizados probados mostraron temperaturas de fusión significativamente mejoradas en comparación con el clon parental 5E5VH5_VL8. Sin embargo, mAb14 tuvo una temperatura de fusión significativamente menor que 5E5VH5_VL8.

Tabla 18. Temperaturas de fusión de los anticuerpos anti-ApoC3 humanizados.

Anticuerpo anti-ApoC3	Temperatura de fusión, °C (EC50)
5E5VH5_VL8	62.9
mAb7	64.2
mAb9	65.9
mAb14	57.1
mAb17	65.9
mAb18	61.8

La termotolerancia de mAb13 se evaluó, además, en el ensayo anterior para determinar si el cambio de termotolerancia observado se relacionaba con la secuencia marco de la línea germinal que se usó para el injerto de las CDR de las variantes 13 y 14. El ensayo se realizó en un intervalo de temperatura extendido para cubrir la temperatura esperada de los anticuerpos humanizados y de 5E5VH5_VL8 (analizado como control). Como se muestra en la Figura 5C, mAb13 y mAb14 tenían curvas de termotolerancia similares, y exhibían temperaturas de fusión de aproximadamente 57 °C, aproximadamente 6 °C

más bajas que las de 5E5VH5_VL8.

El alcance de la invención no se limita por las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, diversas modificaciones de la invención en adición a las descritas resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Tales modificaciones se pretende que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las referencias (por ejemplo, publicaciones o patentes o solicitudes de patentes) citadas en la presente descripción se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia y para todos los fines en la misma medida que si cada referencia individual (por ejemplo, publicación o patente o solicitud de patente) se indicara específicamente e individualmente para incorporarse en su totalidad como referencia para todos los fines.

Otras modalidades están dentro de las siguientes reivindicaciones.