

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 499**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/US2012/042338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12174178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12727767 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2721065**

54 Título: **Anticuerpos anti-ANGPTL3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

17.06.2011 US 201161498518 P

21.12.2011 US 201161578309 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.02.2019

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

SLEEMAN, MARK, W.;

GUSAROVA, VIKTORIA y

MURPHY, ANDREW, J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 699 499 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-ANGPTL3 y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos humanos que se unen específicamente a la proteína 3 similar a angiopoyetina humana (hANGPTL3), y métodos terapéuticos para usar esos anticuerpos.

10

Antecedentes

El gen de la proteína 3 similar a angiopoyetina (ANGPTL3) se identificó a partir de la base de datos EST basándose en secuencias señal y hélices anfipáticas, y posteriormente se aisló un ADNc de ANGPTL3 de longitud completa a partir de una biblioteca de ADNc de hígado/bazo fetal humano (Conklin et al., 1999, Genomics 62: 477-482). La proteína hANGPTL3 de 460 aminoácidos deducida comparte una identidad de secuencia de aminoácidos del 76 % con ANGPTL3 de ratón y tiene la estructura característica de las angiopoyetinas; es decir, un péptido señal, un dominio helicoidal extendido del que se predijo que formará espiras enrolladas dimericas o triméricas, un péptido enlazador corto y un dominio de homología de fibrinógeno globular (FD) (Conklin et al., 1999, *anteriormente citado*). ANGPTL3 contiene los 4 restos de cisteína conservados implicados en los puentes disulfuro intramoleculares dentro del FD; sin embargo, ANGPTL3 no contiene ni las dos cisteínas adicionales ni el motivo característico de unión a calcio que se encuentra en los FD de las angiopoyetinas (ANG; es decir, ANG1, ANG2 y ANG4) (Conklin et al., 1999, *anteriormente citado*), que son factores de crecimiento proteicos que promueven la angiogénesis. Además, a diferencia de las ANG, ANGPTL3 no se une a Tie2; sin embargo, también puede inducir la angiogénesis uniéndose a integrina $\alpha_v\beta_3$ mediante su FD C-terminal (Camenisch et al., 2002, J Biol Chem 277: 17281-17290).

Se obtuvieron datos completos *in vivo* del modelo en ratón KK exogámico, que es moderadamente obeso con niveles anormalmente altos de insulina, glucosa y lípidos en plasma, parecidos a la diabetes mellitus de tipo 2 en seres humanos (Koishi et al., 2002, Nature Genetics 30:151-157). Sin embargo, se descubrió que una sub-estirpe de ratón, la KK/San, exhibía niveles de lípidos en plasma anormalmente bajos (hipolipidemia), que se heredaron como un carácter mendeliano recesivo. Los loci se cartografiaron para el cromosoma 4 y, finalmente, se identificaron como el gen que codifica ANGPTL3, que contenía una inserción de secuencia de nucleótidos de 4 pb en el exón 6 (Koishi et al., 2002, *anteriormente citado*). Por el contrario, los niveles de lípidos en plasma aumentan después de la transferencia mediada por adenovirus del gen de ANGPTL3, o después de la administración de ANGPTL3 humana recombinante en ratones KK/San. Este efecto no fue mediado por cambios en los genes implicados en la síntesis de colesterol, el aclaramiento de lipoproteínas o la oxidación de NEFA (Koishi et al., 2002, *anteriormente citado*). Además, el análisis *in vitro* de la proteína recombinante mostró que ANGPTL3 inhibe directamente la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL), lo que indica que es un modulador del metabolismo lipídico que regula los niveles de triglicéridos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a través de la inhibición de la actividad de la LPL (Shimizugawa et al., 2002, J Biol Chem 277(37): 33742-33748). Se ha demostrado que el dominio de la espira enrollada N-terminal, especialmente los restos 17-165 de la región N-terminal, y no el FD C-terminal, de ANGPTL3, se requiere para su actividad de aumentar los niveles de triglicéridos en plasma en ratones (Ono et al., 2003, J Biol Chem 278: 41804-41809).

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de ANGPTL3 humana se muestran en las SEQ ID NO: 161 y 162, respectivamente. Los anticuerpos contra ANGPTL3 se describen, por ejemplo, los documentos WO2008/073300 y US 7.935.796.

50 **Breve resumen de la invención**

En un primer aspecto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales (mAb) completamente humanos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se definen en las reivindicaciones que específicamente se unen a y neutralizan, inhiben, bloquean, anulan, reducen o interfieren en, al menos una actividad de ANGPTL3, en particular, ANGPTL3 humana (SEQ ID NO: 161). La actividad de ANGPTL3 que puede neutralizarse, inhibirse, bloquearse, anularse, reducirse o interferirse, mediante los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención, incluye, pero sin limitación, la inhibición de la actividad de la LPL, la inducción de la angiogénesis y similares. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede neutralizar, inhibir, bloquear, anular, reducir o interferir en, una actividad de hANGPTL3 uniéndose a un epítipo de hANGPTL3 que está directamente implicado en la actividad dirigida de hANGPTL3. Un anticuerpo o fragmento del mismo también puede neutralizar, inhibir, bloquear, anular, reducir o interferir en, una actividad de hANGPTL3 uniéndose a un epítipo de hANGPTL3 que no está directamente implicado en la actividad dirigida de hANGPTL3, pero el anticuerpo o fragmento que se une al mismo inhibe, bloquea, anula, reduce o interfiere estéricamente o conformacionalmente en, la actividad dirigida de hANGPTL3. Un anticuerpo o fragmento del mismo de la divulgación puede unirse a un epítipo de hANGPTL3 que no está directamente implicado en la actividad dirigida (por ejemplo, inhibir la actividad de la LPL, inducir la angiogénesis y similares) de hANGPTL3 (es decir, un anticuerpo no bloqueante), pero la unión del anticuerpo o fragmento al mismo da como resultado la mejora del aclaramiento de hANGPTL3 de la circulación, en comparación con el aclaramiento de hANGPTL3 en ausencia del anticuerpo o

65

fragmento del mismo, inhibiendo, bloqueando, anulando, reduciendo o interfiriendo en, indirectamente de este modo, una actividad de hANGPTL3. El aclaramiento de hANGPTL3 de la circulación puede mejorarse particularmente al combinar dos o más anticuerpos no bloqueantes diferentes que no compiten entre sí por la unión específica a hANGPTL3.

5 Los anticuerpos (Ab) pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden comprender únicamente una parte de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv) y pueden modificarse para afectar a la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933).

10 En un aspecto, la divulgación comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146 y 180, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 18, 34, 66, 82, 114 y 180. En la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:66.

20 En un aspecto, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154 y 188, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. En otro aspecto, el anticuerpo o parte de unión a antígeno de un anticuerpo comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, 26, 42, 74, 90, 122 y 188. En la invención, el anticuerpo o parte de unión a antígeno de un anticuerpo puede comprender una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74.

30 En aspectos adicionales, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 y 180/188. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de HCVR y LCVR seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 66/74, 82/90, 114/122 y 180/188. En la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender un par de secuencias de HCVR y LCVR de las SEQ ID NO:66/74.

35 En un segundo aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región determinante de complementariedad 3 de cadena pesada (HCDR3) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152 y 186, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y una secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera (LCDR3) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160 y 194, secuencias sustancialmente similares de las mismas que tienen al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que comprende las SEQ ID NO:8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160 o 186/194. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que comprende las SEQ ID NO:8/16, 24/32, 40/48, 72/80, 88/96, 120/128 y 186/194. En la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender un par de secuencias de aminoácidos de HCDR3/LCDR3 que comprende las SEQ ID NO:72/80.

50 En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada (HCDR1) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148 y 182, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada (HCDR2) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150 y 184, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y opcionalmente comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera (LCDR1) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156 y 190, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia; y/o una secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera (LCDR2) seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158 y 192, o una secuencia sustancialmente similar de las mismas que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia.

65 Como alternativa, la divulgación presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende una combinación HCDR1/HCDR2/HCDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:4/6/8, 20/22/24, 36/38/40, 52/54/56, 68/70/72, 84/86/88, 100/102/104, 116/118/120, 132/134/136, 148/150/152 y

182/184/186; y/o una combinación LCDR1/LCDR2/LCDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:12/14/16, 28/30/32, 44/46/48, 60/62/64, 76/78/80, 92/94/96, 108/110/112, 124/126/128, 140/142/144, 156/158/160 y 190/192/194. En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera comprenden una combinación de secuencias de CDR seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/110/112, 116/118/120/124/126/128, 132/134/136/140/142/144, 148/150/152/156/158/160 y 182/184/186/190/192/194. En un aspecto, las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera comprenden una combinación de secuencias de CDR de las SEQ ID NO: 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 116/118/120/124/126/128 o 182/184/186/190/192/194. En una realización, las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera comprenden una combinación de secuencias de CDR de las SEQ ID NO:68/70/72/76/78/80.

En un aspecto relacionado, la divulgación comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a hANGPTL3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende dominios de CDR de cadena pesada y ligera contenidos dentro de pares HCVR/LCVR seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 y 180/188. Los métodos y técnicas para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácido de HCVR y LCVR son conocidas en la técnica y pueden aplicarse para identificar las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos de HCVR y/o LCVR específicas divulgadas en el presente documento. Las definiciones convencionales que pueden aplicarse para identificar los límites de las CDR incluyen la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones de bucles estructurales y la definición de AbM es un compendio entre las estrategias de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273: 927-948 (1997); y Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). También están disponibles bases de datos públicas para identificar las secuencias de CDR dentro de un anticuerpo. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende secuencias de CDR contenidas dentro de un par de HCVR y LCVR de las SEQ ID NO: 2/10, 18/26, 34/42, 66/74, 82/90, 114/122 o 180/188. En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende secuencias de CDR contenidas dentro de un par de HCVR y LCVR de las SEQ ID NO:66/74, en el que las CDR están determinadas por la definición de Kabat, la definición de Chothia o la definición de AbM.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite por la unión específica a hANGPTL3 con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende secuencias de CDR de cadena pesada y ligera contenidas en un par de secuencias HCVR/LCVR de las SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 o 180/188. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno compite por la unión específica a hANGPTL3 con un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un par de secuencias HCVR/LCVR de las SEQ ID NO:66/74. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno compite por la unión específica a hANGPTL3 con un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una combinación de secuencias de CDR de cadena pesada y ligera seleccionada del grupo que consisten en 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/110/112, 116/118/120/124/126/128, 132/134/136/140/142/144, 148/150/152/156/158/160 y 182/184/186/190/192/194. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo compite por la unión específica a hANGPTL3 con un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una combinación de secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO:68/70/72/76/78/80.

En otro aspecto relacionado, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en hANGPTL3 que es reconocido por un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de un par de secuencias HCVR/LCVR de las SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154 o 180/188. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo en hANGPTL3 que el reconocido por el anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un par de secuencias HCVR/LCVR de las SEQ ID NO:66/74. En un aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo se une al mismo epítipo en hANGPTL3 que es reconocido por un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una combinación de secuencias de CDR de cadena pesada y ligera seleccionada del grupo que consisten en 4/6/8/12/14/16, 20/22/24/28/30/32, 36/38/40/44/46/48, 52/54/56/60/62/64, 68/70/72/76/78/80, 84/86/88/92/94/96, 100/102/104/108/110/112, 116/118/120/124/126/128, 132/134/136/140/142/144, 148/150/152/156/158/160 y 182/184/186/190/192/194. En un aspecto, dicho epítipo es reconocido por un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una combinación de secuencias de CDR de cadena pesada y ligera de las SEQ ID NO:68/70/72/76/78/80.

La divulgación presenta un anticuerpo anti-hANGPTL3 asilado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo situado dentro de la región de espira enrollada N-terminal en los restos 17 a 209 de la SEQ ID NO:161 y neutraliza, inhibe, anula, reduce o interfiere en, al menos una actividad de hANGPTL3. La divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo situado dentro de la región de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3 (SEQ ID NO:161) y neutraliza, inhibe, anula, reduce o interfiere en, al menos una actividad de hANGPTL3, anticuerpo o fragmento del mismo que no se une al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170 (corresponde a los restos Glu32 a Leu57 de hANGPTL3 de la SEQ ID NO:161).

Anticuerpos o fragmentos de los mismos de la divulgación se unen específicamente a un epítopo dentro de los restos 17 a 200, 17 a 100, 17 a 70, 17 a 65, 17 a 60, 17 a 57 o 17 a 50, de hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de los restos 40 a 200, 40 a 100, 40 a 70, 50 a 200, 50 a 100, 50 a 70, 58 a 200, 58 a 100, 58 a 70, 58 a 68 o 61 a 66, de hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se une a un epítopo que puede implicar más de uno de los epitopos o restos enumerados dentro de la región de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3, opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170.

En una realización adicional, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-ANGPTL3 o fragmentos de los mismos de la invención. Los vectores de expresión recombinante que portan los ácidos nucleicos de la invención, y células hospedadoras, por ejemplo, células bacterianas, tales como *E. coli* o células de mamífero, tales como células CHO, en las que se han introducido dichos vectores, también están abarcados por la invención, así como métodos de producción de los anticuerpos por cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos y recuperar los anticuerpos producidos.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una HCVR codificada por secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145 y 179, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma. En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una HCVR codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:1, 17, 33, 65, 81, 113 o 179. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una HCVR codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:65.

En un aspecto de la divulgación, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una LCVR codificada por secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153 y 187, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una LCVR codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:9, 25, 41, 73, 89, 121 o 187. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una LCVR codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:73.

En aspectos adicionales de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) codificadas por un par de secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:1/9, 17/25, 33/41, 49/57, 65/73, 81/89, 97/105, 113/121, 129/137, 145/153 y 179/187. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias HCVR/LCVR codificadas por un par de secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO:1/9, 17/25, 33/41, 65/73, 81/89, 113/121 o 179/187. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias HCVR/LCVR codificadas por un par de secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO:65/73.

En un aspecto, la divulgación presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende un dominio HCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151 y 185, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma; y un dominio LCDR3 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159 y 193, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de HCDR3 y LCDR3 codificadas por el par de secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:7/15, 23/31, 39/47, 55/63, 71/79, 87/95, 103/111, 119/127, 135/143, 151/159 y 185/193. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de HCDR3 y LCDR3 codificadas por el par de secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO:7/15, 23/31, 39/47, 71/79, 87/95, 119/127 o 185/193. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un par de secuencias de HCDR3 y LCDR3 codificadas por el par de secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO:71/79.

En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo o fragmento del mismo comprenden un dominio HCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147 y 181, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma; y un dominio HCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149 y 183, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma; y opcionalmente comprende adicionalmente un dominio LCDR1 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155 y 189, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al

menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma; y/o un dominio LCDR2 codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157 y 191, o una secuencia sustancialmente idéntica que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de homología de la misma.

5 Como alternativa, la divulgación presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende una combinación HCDR1/HCDR2/HCDR3 codificada por una combinación de secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:3/5/7, 19/21/23, 35/37/39, 51/53/55, 67/69/71, 83/85/87, 99/101/103, 115/117/119, 131/133/135, 147/149/151 y 181/183/185; y/o una combinación LCDR1/LCDR2/LCDR3
10 codificada por una combinación de secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO:11/13/15, 27/29/31, 43/45/47, 59/61/63, 75/77/79, 91/93/95, 107/109/111, 123/125/127, 139/141/143, 155/157/159 y 189/191/193. En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende secuencias de CDR de cadena pesada y ligera codificadas por una combinación de secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO:67/69/71/75/77/79.

15 En una realización adicional, la invención presenta un anticuerpo anti-ANGPTL3 humano o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) codificada por segmentos de secuencia de nucleótidos derivados de secuencias de línea germinal V_H, D_H y J_H, y una región variable de cadena ligera (LCVR) codificada por segmentos de secuencia de nucleótidos derivados de secuencias de línea germinal V_K y J_K, en el que la HCVR y la LCVR son codificadas por segmentos de secuencia de nucleótidos derivados de una combinación de genes de línea germinal seleccionados del grupo que consiste en: (i) V_H3-43, D_H3-3, J_H3, V_K1-5 y J_K2; (ii) V_H3-11, D_H1-1, J_H4, V_K1-39 y J_K4; (iii) V_H3-30, D_H1-7, J_H6, V_K1-5 y J_K1; (iv) V_H3-30, D_H1-26, J_H6, V_K1-12 y J_K3; (v) V_H3-30, D_H3-10, J_H6, V_K1-12 y J_K3; y (vi) V_H3-23, D_H3-10, J_H4, V_K1-5 y J_K1.

25 En una realización adicional, la invención presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hANGPTL3 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos, tal como se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIACORE™). En determinadas realizaciones, el anticuerpo de la invención exhibe una K_D de 800 pM o menos, aproximadamente 700 pM o menos; 30 aproximadamente 600 pM o menos; aproximadamente 500 pM o menos; aproximadamente 400 pM o menos; aproximadamente 300 pM o menos; aproximadamente 200 pM o menos; aproximadamente 100 pM o menos; o aproximadamente 50 pM o menos.

35 El anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que se une a la proteína hANGPTL3 de la SEQ ID NO:161, puede no reaccionar de forma cruzada con una proteína relacionada, tal como una proteína 4 similar a angiopoyetina humana (hANGPTL4; SEQ ID NO:164), tal como se determina mediante, por ejemplo, ELISA, ensayo de resonancia de plasmón superficial, o tecnología LUMINEX® XMAP®, como se describe en el presente documento. ANGPTL4 es otra proteína secretada que se sabe que reduce la actividad de la LPL y tiene una región de espira enrollada N-terminal y un dominio similar a fibrinógeno C-terminal (Ge et al., 2004, J Biol Chem 279: 2038-2045; Yau et al., 2009, J Biol Chem 284: 11942-11952). En otros aspectos, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una proteína hANGPTL3 y reacciona de forma cruzada con una proteína hANGPTL4. En determinados aspectos, la afinidad de unión del anticuerpo contra hANGPTL3 o fragmento del mismo a la proteína hANGPTL4 es de aproximadamente el 75 % o menos, o aproximadamente el 50 % o menos, de la afinidad de unión del anticuerpo o fragmento a la proteína hANGPTL3.
45

En otro aspecto relacionado, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento de unión a antígeno del mismo que no reacciona de forma cruzada con ANGPTL3 de ratón (mANGPTL3; SEQ ID NO:163), o ANGPTL3 de rata (rANGPTL3; SEQ ID NO:175), pero reacciona de forma cruzada con ANGPTL3 de macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (MfANGPTL3), por ejemplo, con los 17-170 restos N-terminales de la SEQ ID NO:177 (una secuencia de aminoácidos parcial de MfANGPTL3). La invención proporciona un anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento del mismo que reacciona de forma cruzada con MfANGPTL3, mANGPTL3 y rANGPTL3.
50

La invención abarca anticuerpos anti-hANGPTL3 que tienen un patrón de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, la modificación para retirar sitios de glucosilación no deseables puede ser útil, o por ejemplo, retirada de un resto de fucosa para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase, Shield et al., (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, la retirada del sitio de N-glucosilación puede reducir las reacciones inmunitarias no deseables contra los anticuerpos terapéuticos, o aumentar las afinidades de los anticuerpos. En aún otras aplicaciones, puede hacerse modificación de la galactosilación para modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
60

En un aspecto adicional, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano recombinante o fragmento del mismo de la invención, que se une específicamente a hANGPTL3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos anti-ANGPTL3 o fragmentos de los mismos, que no compiten de forma cruzada entre sí, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición farmacéutica puede contener dos
65

o más anticuerpos no bloqueantes, que no compiten entre sí por la unión específica a hANGPTL3 y son eficaces para aclarar hANGPTL3 de la circulación. Las combinaciones adecuadas de anticuerpos no bloqueantes incluyen, pero sin limitación, una combinación de anticuerpos que comprenden pares de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) de: (i) SEQ ID NO:82/90 y 180/188, respectivamente; (ii) SEQ ID NO: 114/122 y 180/188, respectivamente; (iii) SEQ ID NO:82/90 y 18/26, respectivamente; o (iv) SEQ ID NO:114/122 y 18/26, respectivamente.

En realizaciones relacionadas, la invención presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, y un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser uno o más de cualquier agente tal como (1) inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, tales como cerivastatina, atorvastatina, simvastatina, pitavastatina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, y similares; (2) inhibidores de la captación de colesterol y/o la reabsorción de ácidos biliares; (3) niacina, que aumenta el catabolismo de lipoproteínas; (4) fibratos o ácidos carboxílicos anfipáticos, que reducen el nivel de lipoproteína de baja densidad (LDL), mejoran los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) y TG, y reducen el número de ataques cardíacos no mortales; y (5) activadores del factor de transcripción LXR que juega un papel en la eliminación del colesterol tal como 22-hidroxicolesterol, o combinaciones fijas tales como ezetimiba más simvastatina; una estatina con una resina biliar (por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesevelam), una combinación fija de niacina más una estatina (por ejemplo, niacina con lovastatina); o con otros agentes reductores de lípidos, tales como los ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3 (por ejemplo, omacor). Además, el segundo agente terapéutico puede ser uno o más inhibidores de ANGPTL3 diferentes, así como inhibidores de otras moléculas, tales como ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6 y proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), que están implicados en el metabolismo de lípidos, en particular, la homeostasia del colesterol y/o los triglicéridos. Los inhibidores de estas moléculas incluyen moléculas pequeñas y anticuerpos que se unen específicamente a estas moléculas y bloquean su actividad.

En realizaciones relacionadas, el segundo agente terapéutico puede ser uno o más agentes antineoplásicos, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes apoptóticos, y otros agentes bien conocidos en la técnica para tratar el cáncer u otras enfermedades o trastornos proliferativos, así como otros agentes terapéuticos, tales como analgésicos, agentes antiinflamatorios, incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como inhibidores de Cox-2 y similares, para mitigar y/o reducir los síntomas que acompañan al cáncer/tumor subyacente.

En un aspecto adicional, la divulgación presenta métodos para neutralizar, inhibir, bloquear, anular, reducir o interferir en, la actividad de hANGPTL3 usando uno o más anticuerpos anti-hANGPTL3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación. En un aspecto, la divulgación proporciona un método terapéutico que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos anti-hANGPTL3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación y, opcionalmente, uno o más agentes terapéuticos adicionales descritos anteriormente. Los anticuerpos anti-ANGPTL3 o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos neutralizantes o anticuerpos no bloqueantes contra ANGPTL3, o combinaciones de los mismos.

En aspectos relacionados, la divulgación proporciona métodos de mejora del aclaramiento de hANGPTL3 de la circulación de un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto al menos dos anticuerpos anti-hANGPTL3 o fragmentos de los mismos que no compiten entre sí por la unión a hANGPTL3 y preferentemente no bloquean al menos una actividad de hANGPTL3 (es decir, anticuerpos no bloqueantes). Al menos una actividad de hANGPTL3 referida incluye, pero sin limitación, inhibir la actividad de la LPL, inducir la angiogénesis, y similares. En un aspecto, una combinación de al menos dos anticuerpos anti-hANGPTL3 no bloqueantes o fragmentos de los mismos mejora el aclaramiento de hANGPTL3 de la circulación en al menos aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 %, con respecto a no administrar los anticuerpos o fragmentos. Los niveles circulantes de hANGPTL3 se pueden medir mediante ensayos in vitro bien conocidos en la técnica y los descritos en el presente documento. En otro aspecto, la combinación de al menos dos anticuerpos anti-hANGPTL3 no bloqueantes comprende pares de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) de: (i) SEQ ID NO:82/90 y 180/188, respectivamente; (ii) SEQ ID NO: 114/122 y 180/188, respectivamente; (iii) SEQ ID NO:82/90 y 18/26, respectivamente; o (iv) SEQ ID NO:114/122 y 18/26, respectivamente.

La enfermedad o trastorno tratable mediante los métodos descritos en el presente documento es cualquier enfermedad o afección que se mejora, se mitiga, se inhibe o se previene, o cuya tasa de aparición se reduce, en comparación con aquella sin tratamiento con anticuerpo anti-hANGPTL3 (por ejemplo, enfermedades o trastornos mediados por ANGPTL3), retirando, inhibiendo, reduciendo o interfiriendo de otro modo en, la actividad de ANGPTL3. Los ejemplos de enfermedades o trastornos tratables con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, aquellos que implican el metabolismo de lípidos, tales como hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia y dislipidemia, incluyendo dislipidemia aterogénica, dislipemia diabética, hipertrigliceridemia, hipertrigliceridemia grave con TG > 1000 mg/dl, hipercolesterolemia, quilomicronemia, dislipidemia mixta (obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc.), lipodistrofia, lipoatrofia y similares, causadas por, por ejemplo, disminución de la actividad de LPL y/o deficiencia de LPL, disminución de la actividad del receptor de LDL (LDLR) y/o deficiencia del receptor de LDL (por ejemplo, hipercolesterolemia familiar homocigótica con LDLR^{-/-}), ApoC2 alterada, deficiencia de ApoE, aumento de

- ApoB, aumento de la producción y/o disminución de la eliminación de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), ciertos tratamientos farmacológicos (por ejemplo, dislipidemia inducida por el tratamiento con glucocorticoides), cualquier predisposición genética, dieta, estilo de vida y similares. Los métodos también pueden prevenir o tratar enfermedades o trastornos asociados o resultantes de hiperlipidemia, hiperlipoproteinemia y/o dislipidemia, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades o trastornos cardiovasculares, tales como aterosclerosis, aneurisma, hipertensión, angina, ictus, enfermedades cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, arteriopatías coronarias, infarto de miocardio, vasculopatías periféricas y similares; pancreatitis aguda; esteatohepatitis no alcohólica (NASH); trastornos de la glucemia, tales como diabetes; obesidad, y similares.
- Otros ejemplos de enfermedades o trastornos tratables mediante los métodos incluyen cáncer/tumor, así como enfermedades o trastornos asociados con angiogénesis no neoplásicos, incluyendo enfermedades o trastornos angiogénicos oculares, tales como degeneración macular relacionada con la edad, oclusión de la vena central retiniana u oclusión de una rama de la vena retiniana, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro y similares, enfermedades o trastornos inflamatorios, tales como artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis y similares.

Breve descripción de las figuras

- La figura 1 muestra un alineamiento de secuencia de los péptidos 1-3 usados en un experimento de unión a anticuerpo anti-hANGPTL3 (ejemplo 5) contra las partes relevantes de la secuencia de hANGPTL3 (es decir, dentro de los restos 30 a 70 de la SEQ ID NO:161 o GenBank #NP_055310). Péptido 1 (control: péptido ANGPTL4; SEQ ID NO: 168); Péptido 2 (péptido ANGPTL3; SEQ ID NO: 169); y Péptido 3 (péptido ANGPTL3; SEQ ID NO: 170).
- La figura 2 muestra los resultados de la unión del anticuerpo anti-hANGPTL3 a los péptidos de la espira enrollada N-terminal de hANGPTL3 (Péptidos 2 y 3) o hANGPTL4 (Péptido : Control de Isotipo; y : anticuerpo H4H1276S.

Descripción detallada

- Antes de describir la presente invención con detalle, se ha de entender que la presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales descritos en particular, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

- Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque pueden utilizarse en la práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales preferidos.

Definiciones

- La expresión "proteína 3 similar a angiopoyetina humana" o "hANGPTL3", como se usa en el presente documento, se refiere a ANGPTL3 que tiene la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO:162 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:161, o un fragmento biológicamente activo de las mismas.
- El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región constante de cadena pesada (CH; compuesta por los dominios CH1, CH2 y CH3). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.
- También es posible la sustitución de uno o más restos de CDR o la omisión de una o más CDR. Se han descrito anticuerpos en la bibliografía científica en los que se puede prescindir de una o dos CDR para la unión. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9: 133-139) analizaron las regiones de contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basándose en estructuras cristalinas publicadas, y concluyeron que solo aproximadamente de un quinto a un tercio de los restos de CDR realmente entran en contacto con el antígeno. Padlan también descubrió muchos anticuerpos en los que una o dos CDR no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también, Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

- Los restos de CDR que no entran en contacto con el antígeno se pueden identificar basándose en estudios anteriores (por ejemplo, los restos H60-H65 en CDRH2 a menudo no son necesarios), de regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de CDR de Chothia, por modelización molecular y/o empíricamente. Si se omite una CDR o uno o más restos de la misma, generalmente se sustituye con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra

secuencia de anticuerpo humano o un consenso de dichas secuencias. Las posiciones para la sustitución dentro de CDR y los aminoácidos a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas.

- 5 La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los mAb humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, la expresión
- 10 "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir mAb en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, ratón), se han injertado en secuencias FR humanas.

15 Los anticuerpos anti-hANGPTL3 completamente humanos divulgados en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las regiones marco y/o CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondiente. Dichas mutaciones pueden averiguarse fácilmente comparando las secuencias de aminoácidos divulgadas en este documento con secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. La presente divulgación incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos,

20 que se obtienen de cualquiera de las secuencias de aminoácidos divulgadas en este documento, en las que uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones marco y/o CDR están mutados en el resto o restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se obtuvo el anticuerpo, o en el resto o restos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o en una sustitución de aminoácido conservativa del resto o restos de la línea germinal correspondientes (dichos cambios de secuencia se mencionan en este documento colectivamente como

25 "mutaciones de la línea germinal"). Un experto en la materia, partiendo con las secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en este documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más retromutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En determinados aspectos, todos los restos marco y/o CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L mutan de vuelta a los restos encontrados en la secuencia de la línea germinal humana de la que se obtuvo el anticuerpo. En otros aspectos, únicamente determinados restos mutan de vuelta a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, únicamente los restos mutados encontrados dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o únicamente los restos mutados encontrados dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otros aspectos, uno o más de los restos del marco y/o la CDR se mutan al o los restos correspondientes de una secuencia de línea germinal diferente (es decir, una secuencia de línea germinal que es diferente de la secuencia

35 de línea germinal de la que se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones marco y/o CDR, por ejemplo, en las que ciertos restos individuales son mutado a los restos correspondientes de una secuencia de línea germinal particular mientras que determinados otros restos que difieren de la secuencia de línea germinal original se mantienen o son mutados al resto correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de línea germinal pueden ensayarse fácilmente para una o más propiedades deseadas, tales como, especificidad de unión mejorada, afinidad de unión aumentada, propiedades biológicas agonistas o antagonistas (según sea el caso) mejoradas o potenciadas, inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están abarcados dentro de la presente descripción.

45 La presente divulgación también incluye anticuerpos anti-ANGPTL3 que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservativas. Por ejemplo, la presente divulgación incluye anticuerpos anti-ANGPTL3 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, 2 o 1, sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR divulgadas en el presente documento. En un aspecto, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:487 con 10 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otros aspectos, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:487 con 8 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otros aspectos, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:487 con 6 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otro aspecto, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:487 con 4 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otro aspecto más, una HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:487 con 2 o 1 sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En un aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 con 10 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otro aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 con 8 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otro aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 con 6 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otro aspecto, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 con 4 o menos sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior. En otro aspecto más, una LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:44 con 2 o 1 sustituciones de aminoácidos conservativas en su interior.

Salvo que se indique específicamente de otra manera, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, debe entenderse que abarca moléculas de anticuerpo que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, "moléculas de anticuerpo completas"), así como fragmentos de unión a antígeno de las mismas. Las expresiones "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, y similares, como se usan en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glucoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente, que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada, tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que impliquen la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables y (opcionalmente) constantes de anticuerpos. Dicho ADN es conocido y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de anticuerpos de presentación en fagos), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o utilizando técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear restos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Los ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos F_d; (iv) fragmentos F_v; (v) moléculas F_v de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 limitado. Otras moléculas genomanipuladas, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de un dominio, anticuerpos de dominio eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de CDR injertada, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), agentes inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y dominios IgNAR variables de tiburón, también están abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno," como se usa en este documento.

Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y generalmente comprenderá al menos una CDR que está adyacente a o en fase con una o más secuencias marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L, los dominios V_H y V_L pueden situarse uno respecto al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimerica y contener los dímeros V_H-V_H, V_H-V_L o V_L-V_L. Como alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Los ejemplos, no limitativos, de configuraciones de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; y (xiv) V_L-C_L. En cualquier configuración de dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares enumeradas anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar unidos directamente entre sí o pueden estar unidos mediante una bisagra completa o parcial o región conectora. Una región bisagra puede consistir en al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos que producen una unión flexible o semiflexible entre dominios variables y/o constantes adyacentes en una única molécula polipeptídica. Asimismo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homodímero o heterodímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante enumeradas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante uno o más enlaces disulfuro).

Como con las moléculas de anticuerpo completas, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser mono-específicos o multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo típicamente comprenderá al menos dos dominios variables diferentes, en los que cada dominio variable puede unirse específicamente a un antígeno diferente o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpo biespecífico ejemplares divulgados en este documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de la invención pueden estar conjugados a un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunodepresor o un radioisótopo.

La expresión "se une específicamente", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente 1x10⁻⁶ M o menos (es decir, una K_D más pequeña indica una unión más estrecha). Los métodos para determinar si dos moléculas

se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hANGPTL3 puede, sin embargo, exhibir reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de ANGPTL3 de otras especies, por ejemplo, ANGPTL3 de macaco cangrejero, ANGPTL3 de ratón, ANGPTL3 de rata, y/o hANGPTL4 que tiene la

5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:164. Asimismo, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a hANGPTL3 y uno o más antígenos adicionales se consideran, no obstante, anticuerpos que "se unen específicamente a" hANGPTL3, como se usa en este documento.

La expresión anticuerpo "de alta afinidad" se refiere a aquellos anticuerpos que tienen una afinidad de unión a hANGPTL3, expresada como K_D , de aproximadamente 2×10^{-9} M o menos, aproximadamente $1,5 \times 10^{-9}$ M o menos, aproximadamente 1×10^{-9} M o menos, aproximadamente $0,5 \times 10^{-9}$ M o menos, aproximadamente $0,25 \times 10^{-9}$ M o menos, aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, o aproximadamente $0,5 \times 10^{-10}$ M o menos, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA por afinidad en solución.

15 El término " K_D ", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación en equilibrio de una interacción particular de anticuerpo-antígeno.

Por la expresión "disociación lenta", "Koff" o " k_d " se entiende un anticuerpo que se disocia de hANGPTL3 con una constante de velocidad de $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™.

Por la expresión "constante de afinidad intrínseca" o " k_a " se entiende un anticuerpo que se asocia con hANGPTL3 a una constante de velocidad de aproximadamente $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o mayor, tal como se determina mediante resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, BIACORE™.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros mAb que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une de manera específica a hANGPTL3 es sustancialmente libre de mAb que se unen de manera específica a antígenos que no sean hANGPTL3). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hANGPTL3 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de ANGPTL3 de otras especies, tales como macaco cangrejero, ratón, rata, y/u otras proteínas relacionadas, tales como ANGPTL4 humana.

Un anticuerpo "neutralizante", "bloqueante" o "anulante", como se usa en el presente documento (o un anticuerpo que "neutraliza", "bloquea" o "anula" la actividad de ANGPTL3), pretende hacer referencia a un anticuerpo cuya unión a ANGPTL3 da como resultado la inhibición directa de al menos una actividad biológica de ANGPTL3, tal como se evalúa mediante ensayos *in vitro* estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, véase los ejemplos más adelante). Los términos, "neutralizar", "inhibir", "bloquear" y "anular", pueden usarse en el presente documento indistintamente. Un anticuerpo "no bloqueante" se refiere a un anticuerpo cuya unión a ANGPTL3 no bloquea directamente una actividad dirigida de ANGPTL3 tal como se evalúa por ensayos *in vitro* estándar, pero aun así puede ser un anticuerpo "interferente" cuya unión a ANGPTL3 produce inhibición indirecta, reducción, atenuación u otra interferencia de al menos una actividad biológica de ANGPTL3 *in vivo*, por ejemplo, mejorando el aclaramiento de ANGPTL3 de la circulación. El aclaramiento de ANGPTL3 de la circulación puede mejorarse particularmente mediante una combinación de al menos dos anticuerpos no bloqueantes. La neutralización, inhibición, anulación, reducción, atenuación o interferencia de una actividad biológica de ANGPTL3 puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de ANGPTL3 por uno o más de varios ensayos *in vitro* o *in vivo* estándar conocidos en la técnica (véase también los ejemplos más adelante).

La expresión "resonancia de plasmón superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biodetectora, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.).

El término "epítipo" es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. Los epítipos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítipos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítipos estructurales y tienen aquellos restos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítipos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos por aminoácidos no lineales. En determinadas realizaciones, los epítipos pueden incluir determinantes que son grupos de moléculas químicamente activas en la superficie tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.

La expresión "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando hace referencia a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean de forma óptima con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente un 90 %, y más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o GAP, como se analiza a continuación.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos el 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En casos donde dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de grado de similitud puede ajustarse a la alza para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo-alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácido conservativa son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como alternativa, un remplazo conservativo es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 divulgada en Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443 45. Un remplazo "moderadamente conservativo" es cualquiera cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

La similitud de secuencia para polipéptidos se mide típicamente usando un software de análisis de secuencia. El programa informático de análisis de proteínas acopla secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, eliminaciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el programa informático GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que pueden usarse con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos muy relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo silvestre y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también pueden compararse usando FASTA con parámetros por defecto o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) *anteriormente citado*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, usando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403 410 y (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389, 402.

Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, la edad y el tamaño del sujeto tratado, la vía de administración y similares y la podrá averiguar un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Preparación de anticuerpos humanos

Los métodos para generar anticuerpos humanos en ratones transgénicos se conocen en la técnica. Cualquiera de dichos métodos conocidos puede usarse en el contexto de la presente invención para preparar anticuerpos humanos que se unan específicamente a ANGPTL3.

Usando la tecnología VELOCIMMUNE™ o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, inicialmente se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad contra ANGPTL3 que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Como en la siguiente sección experimental, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan para las características deseables, incluyendo la afinidad, selectividad, epitopo, y similares.

En general, los anticuerpos de la presente invención poseen altas afinidades, poseyendo típicamente una K_D de aproximadamente 10^{-12} M a aproximadamente 10^{-9} M, cuando se miden mediante unión a antígeno inmovilizado sobre fase sólida o en fase en solución. Las regiones constantes de ratón son reemplazadas con regiones constantes humanas deseadas, por ejemplo, IgG1 o IgG4 de tipo silvestre, o IgG1 o IgG4 modificadas, para generar los anticuerpos completamente humanos de la invención. Aunque la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, las características de unión a antígeno de alta afinidad y especificidad de diana de los anticuerpos residen en la región variable.

Cartografiado de epítomos y tecnologías relacionadas

Para explorar para anticuerpos que se unen con un epítopo particular, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en *Antibodies*, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY). Otros

métodos incluyen mutantes de barrido de alanina, transferencias de péptidos (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), o análisis de escisión de péptidos. Además, pueden emplearse métodos tales como escisión de epítomos, extracción de epítomos y modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Protein Science* 9: 487-496).

- 5 El término "epítipo" se refiere a un lugar sobre un antígeno al que responden linfocitos B y/o T. Los epítomos de linfocitos B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se mantienen al tratarlos con disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados mediante plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

15 El perfilado asistido por modificación (MAP), también conocido como perfilado de anticuerpos basado en la estructura del antígeno (ASAP) es un método que categoriza grandes números de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies de antígenos modificadas química o enzimáticamente (US 2004/0101920). Cada categoría puede reflejar un epítipo único diferente o parcialmente superpuesto con el epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología permite el filtrado rápido de mAb genéticamente idénticos, de modo que la caracterización puede centrarse en mAb genéticamente distintos. Cuando se aplica al cribado de hibridomas, MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridomas raros que producen mAb que tienen las características deseadas. MAP se puede usar para clasificar los mAb anti-ANGPTL3 de la invención en grupos de mAb que se unen a diferentes epítomos.

25 ANGPTL3 contiene un dominio de espira enrollada amino-terminal y un dominio similar a fibrinógeno (FD) carboxilo-terminal y la proteína ANGPTL3 forma un oligómero en ausencia de enlaces disulfuro intermoleculares (Ge et al., 2005, *J Lipid Res* 46:1484-1490). Se ha notificado de que el dominio de espira enrollada N-terminal es importante en la inhibición de la actividad de la LPL (Ono et al., 2003, *J Biol Chem* 278: 41804-41809). El anticuerpo anti-hANGPTL3 o el fragmento de unión a antígeno de la divulgación se une a un epítipo dentro del dominio de espira enrollada N-terminal (restos 17-209) de hANGPTL3 (SEQ ID NO: 161) y neutraliza al menos una actividad de hANGPTL3 (por ejemplo, inhibición de la actividad de la LPL). El anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro del dominio de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3 y neutraliza al menos una actividad de hANGPTL3, con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170. El anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse específicamente a un epítipo dentro de los restos 17 a 200, 17 a 100, 17 a 70, 17 a 65, 17 a 60, 17 a 57, 17 a 55, 17 a 50, 17 a 45, 17 a 40, o 17 a 35, de hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170. El anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse específicamente a un epítipo dentro de los restos 40 a 200, 40 a 100, 40 a 70, 50 a 200, 50 a 100, 50 a 70, 58 a 200, 58 a 100, 58 a 70, 58 a 68, o 61 a 66 (conocido como "motivo de unión a heparina") de hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se une a un epítipo que puede implicar más de uno de los epítomos o restos enumerados dentro de la región de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3, opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170.

45 En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo contra hANGPTL3 o fragmento del mismo se une a uno o más fragmentos de hANGPTL3, por ejemplo, un fragmento de al menos 5 restos, al menos 7 restos, al menos 10 restos, al menos 20 restos, al menos 30 restos, al menos 50 restos, al menos 70 restos, al menos 100 restos, al menos 150 restos o al menos 200 restos, de hANGPTL3 (SEQ ID NO:161), opcionalmente con la condición de que el anticuerpo o fragmento del mismo no se una al péptido ANGPTL3 de la SEQ ID NO:170.

50 La presente divulgación incluye anticuerpos contra hANGPTL3 que se unen al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en el presente documento. Asimismo, la presente divulgación también incluye anticuerpos anti-hANGPTL3 que compiten por la unión a hANGPTL3 o un fragmento de hANGPTL3 con cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en el presente documento.

55 Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo que, o compite por la unión con, un anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia usando métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína o péptido hANGPTL3 en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de ensayo de unirse a la molécula hANGPTL3. Si el anticuerpo de ensayo puede unirse a hANGPTL3 después de unión por saturación con el anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia, puede concluirse que el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente del anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de ensayo no puede unirse a la molécula hANGPTL3 después de la unión por saturación con el anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo puede unirse al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia.

65 Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo anti-hANGPTL3 de referencia, se realiza la

metodología de unión descrita anteriormente en dos orientaciones: en una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una molécula hANGPTL3 en condiciones de saturación seguido por evaluación de la unión del anticuerpo de ensayo a la molécula hANGPTL3. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de ensayo se una a una molécula hANGPTL3 en condiciones de saturación seguido por evaluación del anticuerpo de referencia a la molécula hANGPTL3. Si, en ambas orientaciones, únicamente el primer anticuerpo (de saturación) puede unirse a la molécula hANGPTL3, entonces se concluye que el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo de referencia compiten por la unión a hANGPTL3. Como apreciará un experto en la materia, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia puede que no se una necesariamente al epítipo idéntico al anticuerpo de referencia, sino que puede bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia mediante la unión a un epítipo solapante o adyacente.

Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o epítopos solapantes si cada uno inhibe (bloquea) competitivamente la unión del otro al antígeno. Es decir, un exceso de factor 1, 5-, 10-, 20 o 100 de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50 %, pero preferentemente un 75 %, 90 % o incluso un 99 % medida en un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res, 1990:50:1495-1502). Como alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácido en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos solapantes si algunas mutaciones de aminoácido que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

Entonces puede realizarse experimentación rutinaria adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) para confirmar si la ausencia observada de unión del anticuerpo de ensayo se debe, de hecho, a la unión al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la ausencia de la unión observada. Los experimentos de este tipo pueden realizarse usando ELISA, RIA, resonancia del plasmón superficial, citometría de flujo o cualquier otro ensayo cuantitativo o cualitativo de unión de anticuerpos disponible en la técnica.

Inmunoconjugados

La invención abarca un anticuerpo monoclonal anti-ANGPTL3 humano conjugado con un resto terapéutico ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, un inmunodepresor o un radioisótopo. Los agentes de citotoxina incluyen cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos de agentes de citotoxina adecuados y agentes quimioterapéuticos para formar inmunoconjugados son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, documento WO 05/103081.

Biespecíficos

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los mAb multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido diana o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147:60-69. Los mAb anti-hANGPTL3 humanos pueden unirse a o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse de forma funcional (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión.

Un formato de anticuerpo biespecífico ejemplar que puede usarse en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio C_H3 de Ig, en el que el primer y el segundo dominio C_H3 de Ig difieren entre sí en al menos un aminoácido, y en el que al menos una diferencia de aminoácido reduce la unión del anticuerpo biespecífico a proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de aminoácido. En una realización, el primer dominio C_H3 de Ig se une a una proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o anula la unión a proteína A tal como una modificación H95R (por numeración de exones IMGT; H435R por numeración EU). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos IgG4. Se contemplan variaciones en el formato de anticuerpo bi-específico descrito anteriormente.

Bioequivalentes

Los anticuerpos anti-hANGPTL3 y fragmentos de anticuerpo de la presente divulgación abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían respecto a las de los mAb descritos, pero que conservan la capacidad de unión a ANGPTL3 humana. Dichos mAb variantes y fragmentos de anticuerpo comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia precursora, pero muestran actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los mAb descritos. Asimismo, las secuencias de ADN

que codifican el anticuerpo anti-hANGPTL3 de la presente divulgación abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia divulgada, pero que codifican un anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo anti-hANGPTL3 o fragmento de anticuerpo de la divulgación. Los ejemplos de dichas secuencias variantes de aminoácido y ADN se analizan anteriormente.

Dos proteínas de unión a antígeno o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, en una sola dosis o en múltiples dosis. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción, pero no en su tasa de absorción y aún pueden considerarse bioequivalentes porque dichas diferencias en la tasa de absorción son intencionadas y se reflejan en el marcado, no son esenciales para obtener las concentraciones eficaces del fármaco en el organismo en, por ejemplo, uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacológico particular estudiado. En un aspecto, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente importantes en su seguridad, pureza y potencia.

En un aspecto, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o eficacia disminuida, en comparación con tratamiento continuado sin dicho cambio.

En un aspecto, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo o mecanismos comunes de acción para la afección o afecciones de uso, en la medida en que dichos mecanismos sean conocidos.

La bioequivalencia puede demostrarse por métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en que se mide la concentración del anticuerpo o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro líquido biológico como una función del tiempo; (b) un ensayo *in vitro* que sea correlacionado con y es razonablemente predictivo de datos de biodisponibilidad *in vivo* en seres humanos; (c) un ensayo *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en que se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

Las variantes bioequivalentes de anticuerpos anti-hANGPTL3 de la divulgación pueden construirse, por ejemplo, generando diversas sustituciones de restos o secuencias o eliminando restos terminales o internos o secuencias no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los restos de cisteína no esenciales para la actividad biológica pueden eliminarse o remplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización.

40 Administración terapéutica y formulaciones

La invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-hANGPTL3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención y también se refiere a métodos terapéuticos que los usan. La administración de composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se administrará con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia y similares mejoradas. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido para todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de grasa en agua y agua en grasa, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversas masas moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contiene Carbowax. Véase también, Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

La dosis puede variar dependiendo de la edad y el tamaño de un sujeto a recibir la administración, la enfermedad diana, la finalidad del tratamiento, las condiciones, la vía de administración y similares. Cuando el anticuerpo de la presente invención se usa para tratar diversas afecciones y enfermedades asociadas directa o indirectamente con ANGPTL3, incluyendo hipercolesterolemia, trastornos asociados con LDL y apolipoproteína B, y trastornos del metabolismo de lípidos, y similares, en un paciente adulto, es ventajoso administrar por vía intravenosa o por vía subcutánea el anticuerpo de la presente invención en una única dosis de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 7, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la gravedad de la afección, la frecuencia y la duración del tratamiento, pueden ajustarse. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede administrarse como una dosis inicial de al menos aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 800 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg, o

aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg, hasta aproximadamente 100 mg, o hasta aproximadamente 50 mg. En determinadas realizaciones, la dosis inicial puede ir seguida de la administración de una segunda o una pluralidad de dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en una cantidad que puede ser aproximadamente la misma o menor que la de la dosis inicial, en la que las dosis posteriores están separadas por al menos 1 día a 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composiciones farmacéuticas de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través del revestimiento epitelial o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

La composición farmacéutica también puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer (1990) *Science* 249:1527-1533; Treat et al. (1989) en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365; Lopez-Berestein, *ibíd.*, págs. 317-327; véase generalmente en el mismo lugar).

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba (véase Langer, anteriormente citado; Sefton (1987) *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974). En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede ubicarse en proximidad de la diana de la composición, requiriendo por tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138, 1984).

Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos para el público. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrita anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente usado para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxitileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleaginoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección así preparada se llena preferentemente en una ampolla apropiada. Una composición farmacéutica de la presente invención puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración de pluma ya tiene aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de administración de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma entonces puede reutilizarse. En un dispositivo de administración de pluma desechable, no hay un cartucho reemplazable. En su lugar, el dispositivo de administración de pluma desechable viene prellenado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, el dispositivo completo se desecha.

Numerosos dispositivos de administración de pluma y autoinyector reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, aunque ciertamente sin limitación, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, RU), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly y Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Los ejemplos de dispositivos de administración de pluma desechables que tienen aplicaciones en administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, aunque ciertamente sin limitación, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly).

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en

formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Dichas formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo mencionado anteriormente contenida generalmente es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 800 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, El anticuerpo mencionado anteriormente está contenido en de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, en de aproximadamente 5 a 300 mg, en de aproximadamente 8 a 200 mg, y en de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg para las otras formas de dosificación.

Terapias de combinación

La invención proporciona además anticuerpos contra hANGPTL3 o fragmentos de los mismos de la invención en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para uso en métodos terapéuticos para tratar enfermedades o trastornos, como se define en las reivindicaciones, que están asociados directa o indirectamente con hANGPTL3. El agente terapéutico adicional puede ser uno o más de cualquier agente que se combine ventajosamente con uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención, incluyendo inhibidores de la HMG-CoA reductasa, tales como cerovastatina, atorvastatina, simvastatina, pitavastina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, y similares; niacina; diversos fibratos, tales como fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato, gemfibrozil, y similares; activadores del factor de transcripción LXR, y similares. Además, el anticuerpo hANGPTL3 o fragmento del mismo de la invención puede administrarse con otros inhibidores de ANGPTL3 así como con inhibidores de otras moléculas, tales como ANGPTL4, ANGPTL5, ANGPTL6 y proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), que están implicados en el metabolismo de lípidos, en particular, la homeostasia del colesterol y/o los triglicéridos. Los inhibidores de estas moléculas incluyen moléculas pequeñas y anticuerpos que se unen específicamente a estas moléculas y bloquean su actividad (véase, por ejemplo, los anticuerpos anti-PCSK9 divulgados en el documento U.S. 2010/0166768 A1).

Además, el agente terapéutico adicional puede ser uno o más agentes antineoplásicos, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes apoptóticos, y otros agentes bien conocidos en la técnica para tratar el cáncer u otras enfermedades o trastornos proliferativos. Los ejemplos de agentes antineoplásicos incluyen, pero sin limitación, un agente antimitótico, tal como docetaxel, paclitaxel, y similares; un compuesto quimioterapéutico a base de platino, tal como cisplatino, carboplatino, iproplatino, oxaliplatino, y similares; u otro agente citotóxico convencional, tal como 5-fluorouracilo, capecitabina, irinotecán, leucovorina, gemcitabina, y similares, y agentes antiangiogénicos, incluyendo antagonistas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tales como anticuerpos anti-VEGF, por ejemplo, bevacizumab (AVASTIN®, Genentech) y un bloqueante basado en receptor de VEGF, por ejemplo, la "trampa de VEGF" descrita en la patente de Estados Unidos n.º 7.070.959, antagonistas del ligando 4 de tipo delta (DII4), tales como anticuerpos anti-DII4 como se describe en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2008/0181899, y una proteína de fusión que contiene el dominio extracelular de DII4, por ejemplo, DII4-Fc como se describe en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2008/0107648; inhibidores de tirosina cinasa receptora y/o la angiogénesis, incluyendo sorafenib (NEXAVAR® de Bayer Pharmaceuticals Corp.), sunitinib (SUTENT® de Pfizer), pazopanib (VOTRIENT™ de GlaxoSmithKline), toceranib (PALLADIA™ de Pfizer), vandetanib (ZACTIMA™ de AstraZeneca), cediranib (RECENTIN® de AstraZeneca), regorafenib (BAY 73-4506 de Bayer), axitinib (AG013736 de Pfizer), lestaurtinib (CEP-701 de Cephalon), erlotinib (TARCEVA® de Genentech), gefitinib (IRESSA™ de AstraZeneca), BIBW 2992 (TOVOK™ de Boehringer Ingelheim), lapatinib (TYKERB® de GlaxoSmithKline), neratinib (HKI-272 de Wyeth/Pfizer), y similares, y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Además, otros agentes terapéuticos, tales como analgésicos, agentes antiinflamatorios, incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como inhibidores de Cox-2 y similares, también pueden administrarse con el anticuerpo contra hANGPTL3 o fragmento del mismo de la invención para mitigar y/o reducir los síntomas que acompañan al cáncer/tumor subyacente.

El anticuerpo contra hANGPTL3 o fragmento del mismo de la invención y el agente o agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse juntos o por separado. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención y los agentes adicionales pueden administrarse de forma concurrente o por separado en momentos escalonados, es decir, secuencialmente, en órdenes apropiados.

Usos de diagnóstico de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-ANGPTL3 de la presente invención también pueden usarse para detectar y/o medir ANGPTL3 en una muestra, por ejemplo, con fines de diagnóstico. Por ejemplo, un Ab anti-ANGPTL3, o fragmento del mismo, puede usarse para diagnosticar una afección o enfermedad caracterizada por la expresión aberrante (por ejemplo, sobreexpresión, subexpresión, ausencia de expresión, etc.) de ANGPTL3. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para ANGPTL3 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra obtenida de un paciente, con un Ab anti-ANGPTL3 de la invención, en el que el anticuerpo anti-ANGPTL3 está marcado con una marca detectable o molécula informadora o se usa para capturar y aislar selectivamente la proteína ANGPTL3 de las muestras del paciente. Como alternativa, puede usarse un Ab anti-ANGPTL3 no marcado en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está marcado de forma detectable por sí mismo. la marca detectable o molécula indicadora puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹³¹I o ¹²⁵I; un resto fluorescente o

quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, o rodamina; o una enzima tal como una fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa de rábano rústico o luciferasa. Los ensayos que pueden usarse para detectar o medir ANGPTL3 en una muestra incluyen ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y similares.

5

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación completa y descripción de la manera en que preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados, pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados Celsius y la presión es en o cerca de atmosférica.

15 Ejemplo 1: Generación de anticuerpos humanos contra ANGPTL3 humano

Se inmunizaron ratones VELOCIMMUNE™ con ANGPTL3 humana, y la respuesta inmunitaria del anticuerpo se supervisó mediante inmunoensayo específico de antígeno usando suero obtenido de estos ratones. Se recogieron linfocitos B que expresaban anti-hANGPTL3 de los bazo de ratones inmunizados que mostraron tener títulos elevados de anticuerpos anti-hANGPTL3 y se fusionaron con células de mieloma de ratón para formar hibridomas. Los hibridomas se cribaron y se seleccionaron para identificar líneas celulares que expresaban anticuerpos específicos para hANGPTL3 usando ensayos como se describe a continuación. Los ensayos identificaron varias líneas celulares que produjeron anticuerpos anti-hANGPTL3 quiméricos, por ejemplo, H1M896N.

25 Los anticuerpos específicos para ANGPTL3 humana también se aislaron directamente de linfocitos B inmunizados con antígenos sin fusión a células de mieloma, tal como se describe en el documento U.S. 2007/0280945 A1. Se clonaron regiones variables de cadena pesada y ligera para generar anticuerpos anti-hANGPTL3 completamente humanos del isotipo IgG4 designados H4H1248P, H4H1250P, H4H1263S, H4H1268S, H4H1276S, H4H1279P, H4H1282P, H4H1292P, H4H1295P y H4H1296P. Se establecieron líneas celulares de CHO que expresaban anticuerpo recombinantes.

30

Ejemplo 2. Análisis de utilización de genes variables

Para analizar la estructura de los anticuerpos producidos, los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables del anticuerpo se clonaron y secuenciaron. A partir de la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos predicha de los anticuerpos, se identificó el uso genes para cada región variable de cadena pesada (HCVR) y región variable de cadena ligera (LCVR). La tabla 1 muestra el uso de genes para anticuerpos seleccionados de acuerdo con la invención.

40

Tabla 1

Anticuerpo	HCVR		LCVR		
	V _h	D _h	J _H	V _k	J _K
H4H1248P	3-30	1-26	6	1-12	3
H4H1250P	3-30	1-7	6	1-5	1
H4H1263S	3-30	3-10	6	1-12	3
H4H1268S	6-1	6-6	4	1-5	1
H4H1276S	3-43	3-3	3	1-5	2
H4H1279P	3-11	1-1	4	1-39	4
H4H1282P	1-18	3-10	4	1-9	4
H4H1292P	3-11	1-1	4	1-39	4
H4H1295P	1-18	6-25	4	2-30	2
H4H1296P	3-11	1-1	4	1-39	4
H1M896N	3-23	3-10	4	1-5	1

La tabla 2 muestra las parejas de secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpos anti-hANGPTL3 seleccionados y sus identificadores de anticuerpo correspondientes. Las denominaciones N, P y S se refieren a anticuerpos que tienen cadenas pesadas y ligeras con secuencias CDR idénticas, pero con

variaciones de secuencia en las regiones que están fuera de las secuencias CDR (es decir, las regiones marco). Por tanto, las variantes N, P y S de un anticuerpo particular tienen secuencias CDR idénticas dentro de sus regiones variables de cadena pesada y ligera, pero contienen modificaciones dentro de las regiones marco.

5

Tabla 2

Nombre	HCVR/LCVR SEQ ID NO	Nombre	HCVR/LCVR SEQ ID NO
H4H1248P	2/10	H4H1279P	82/90
H4H1250P	18/26	H4H1282P	98/106
H4H1263S	34/42	H4H1292P	114/122
H4H1268S	50/58	H4H1295P	130/138
H4H1276S	66/74	H4H1296P	146/154
H1M896N	180/188	-	-

Ejemplo 3. Parámetros cinéticos de anticuerpos anti-hANGPTL3 que se unen a ANGPTL3

10 Todos los experimentos de unión cinéticos se realizaron a 25 °C o 37 °C en un instrumento de interacción molecular BIACORE™ T200 sin marcador (GE Healthcare) usando un chip sensor CM5. En resumen, se generó una superficie de captura de antígenos acoplado covalentemente un anticuerpo específico de IgG anti-ratón (anti-mFc; GE Healthcare; n° de catálogo BR-1008-38) o un anticuerpo específico anti-pentahistidina (Qiagen; n° de catálogo 34660) a la superficie de un chip sensor CM5 usando un método de acoplamiento de amina convencional. Usando HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %, pH 7,4) o PBSP (fosfato de sodio 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, tensioactivo P20 al 0,025 %, pH 7,2 o 5,75) como tampón de migración, se capturaron ANGPTL3 humana y de especies variantes con marcas de oligohistidina sobre la superficie acoplada anti-pentahistidina hasta que se consiguió una respuesta de unión de 4,4-46,5 RU. Las proteínas recombinantes capturadas fueron: ANGPTL3 humana madura de longitud completa (es decir, restos de aminoácidos 17-460 de la SEQ ID NO:161) con una marca de decahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; n.º de catálogo 3829-AN], dominio de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3 (es decir, restos de aminoácidos 17-170 de la SEQ ID NO:161) que contiene una marca de hexahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-170)-His], dominio de espira enrollada N-terminal de ANGPTL3 de *Macaca fascicularis* [es decir, restos de aminoácidos 17-170 de la SEQ ID NO:177 (una secuencia parcial de ANGPTL3 de *Macaca fascicularis*)] que contiene una marca myc-myc-hexahistidina [MfANGPTL3(17-170)-mmH; SEQ ID NO:167], ANGPTL3 madura de longitud completa de *Mus musculus* (es decir, restos de aminoácidos 17-455 de la SEQ ID NO:163) con una marca de decahistidina C-terminal [mANGPTL3(17-455)-His; R&D Systems, MN; n.º de catálogo 136-AN], dominio de espira enrollada N-terminal de ANGPTL3 de *Mus musculus* (es decir, restos de aminoácidos 17-240 de la SEQ ID NO:163) que contiene una marca de hexahistidina [mANGPTL3(17-240)-His; SEQ ID NO:166], y dominio de espira enrollada N-terminal de ANGPTL3 de *Rattus norvegicus* (es decir, restos de aminoácidos 17-240 de la SEQ ID NO:175) que contiene una marca myc-myc-hexahistidina [rANGPTL3(17-240)-mmH; SEQ ID NO:176]. Además, el dominio de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3 (es decir, restos de aminoácidos 17-169 de la SEQ ID NO:161) que contiene una fusión Fc de ratón C-terminal [hANGPTL3(17-169)-mFc; SEQ ID NO:165] se capturó sobre la superficie acoplada anti-mFc hasta que se consiguió una respuesta de unión de 24,8 ± 1,5 RU. Para medir las velocidades de asociación y disociación para la formación del complejo anticuerpo/antígeno, se inyectaron concentraciones de anticuerpo únicas (tablas 3 y 7) o múltiples (tablas 4-6) a través de la superficie de la proteína capturada a un caudal de 50 µl/minuto durante 3 minutos y la disociación del complejo se supervisó durante 20 minutos. Los datos de unión se procesaron y se ajustaron a un modelo de unión 1:1 con transporte masivo usando Scrubber versión 2.0a (BioLogic Software). Las semividas cinéticas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de la constante de velocidad de disociación, kd.

40 La tabla 3 muestra la unión de diversos anticuerpos anti-ANGPTL3 a hANGPTL3 a 25 °C, pH 7,4, en tampón HBS-EP.

Tabla 3

Clones de Ab	Proteína	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	Kd (nM)	T _{1/2} (min)
H4H1248P	hANGPTL3(17-169)-mFc	4,57E+05	2,72E-03	5,95	4
	hANGPTL3(17-460)-His	4,40E+05	2,47E-03	5,62	5
H4H1250P	hANGPTL3(17-169)-mFc	1,25E+06	6,51E-04	0,519	18
	hANGPTL3(17-460)-His	9,04E+05	6,57E-04	0,726	18
H4H1263S	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,77E+05	4,22E-03	6,23	3

	hANGPTL3(17-460)-His	5,08E+05	1,26E-03	2,47	9
H4H1268S	hANGPTL3(17-169)-mFc	1,16E+06	8,35E-04	0,721	14
	hANGPTL3(17-460)-His	1,29E+06	1,89E-03	1,47	6
H4H1276S	hANGPTL3(17-169)-mFc	5,82E+05	3,83E-04	0,659	30
	hANGPTL3(17-460)-His	3,44E+05	4,64E-04	1,35	25
H4H1279P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,58E+05	5,53E-06	0,00841	2088
	hANGPTL3(17-460)-His	2,88E+05	1,14E-04	0,394	102
H4H1282P	hANGPTL3(17-169)-mFc	1,28E+06	5,92E-05	0,0463	195
	hANGPTL3(17-460)-His	9,57E+05	9,26E-05	0,0968	125
H4H1292P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,86E+05	1,77E-04	0,257	65
	hANGPTL3(17-460)-His	3,41E+05	2,48E-04	0,727	47
H4H1295P	hANGPTL3(17-169)-mFc	3,52E+05	7,95E-05	0,226	145
	hANGPTL3(17-460)-His	3,73E+05	7,35E-05	0,197	157
H4H1296P	hANGPTL3(17-169)-mFc	6,41E+05	3,92E-05	0,0611	295
	hANGPTL3(17-460)-His	3,01E+05	4,12E-05	0,137	280

Tal como se muestra en la Tabla 3, los anticuerpos anti-hANGPLT3 se unen a la proteína de longitud completa con una marca de decahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-460)-His] con constantes de disociación en equilibrio calculadas ($KD = kd/ka$) que varían entre 96,8 pM y 5,62 nM y hasta el dominio de espira enrollada N-terminal con una fusión Fc C-terminal [hANGPTL3(17-169)-mFc] con KD que varían entre 8,41 pM y 6,23 nM.

Las tablas 4 y 5 muestran la unión cruzada entre especies de H4H1276S a ANGPTL3 a 25 °C y 37 °C, respectivamente, a pH 7,4, en tampón HBS-EP. La tabla 6 muestra la unión de H4H1276S a ANGPTL3 humana y de macaco, a 25 °C o 37 °C, a pH 5,75 o pH 7,2, en tampón PBSP.

Tabla 4

Clon de Ab	Proteína	25 °C			
		ka ($M^{-1} s^{-1}$)	kd (s^{-1})	Kd (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1276S	hANGPTL3(17-170)-His	9,73E+05	9,12E-04	0,938	12,7
	hANGPTL3(17-460)-His	5,88E+05	2,89E-04	0,491	40,0
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,35E+06	5,35E-04	0,396	21,6
	mANGPTL3(17-240)-His	6,70E+05	3,07E-04	0,458	37,6
	mANGPTL3(17-455)-His	1,29E+06	3,46E-04	0,268	33,4
	rANGPTL3(17-240)-mmH	1,35E+06	7,18E-04	0,530	16,1

Tabla 5

Clon de Ab	Proteína	37 °C			
		ka ($M^{-1} s^{-1}$)	kd (s^{-1})	Kd (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1276S	hANGPTL3(17-170)-His	1,59E+06	2,41E-03	1,52	4,8
	hANGPTL3(17-460)-His	6,32E+05	8,12E-04	1,29	14,2
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,87E+06	1,17E-03	0,625	9,9
	mANGPTL3(17-240)-His	8,19E+05	9,64E-04	1,18	12,0
	mANGPTL3(17-455)-His	1,94E+06	7,91E-04	0,408	14,6
	rANGPTL3(17-240)-mmH	2,05E+06	1,93E-03	0,940	6,0

Tabla 6

Clon de Ab	Proteína	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _d (nM)	t _{1/2} (min)
H4H1276S pH 7,2 25 °C	hANGPTL3(17-170)-His	1,00E+06	1,10E-03	1,09	10,5
	hANGPTL3(17-460)-His	5,99E+05	4,02E-04	0,670	28,8
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,45E+06	5,38E-04	0,370	21,5
H4H1276S pH 5,75 25 °C	hANGPTL3(17-170)-His	2,80E+05	6,72E-03	24,0	1,7
	hANGPTL3(17-460)-His	7,32E+04	4,94E-03	67,5	2,3
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	2,06E+05	4,32E-03	21,0	2,7
H4H1276S pH 7,2 37 °C	hANGPTL3(17-170)-His	1,57E+06	2,73E-03	1,74	4,2
	hANGPTL3(17-460)-His	6,67E+05	1,18E-03	1,76	9,8
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	1,94E+06	1,36E-03	0,700	8,5
H4H1276S pH 5,75 37 °C	hANGPTL3(17-170)-His	1,22E+06	3,24E-02	26,7	0,4
	hANGPTL3(17-460)-His	4,71E+04	1,07E-02	227	1,1
	MfANGPTL3(17-170)-mmH	2,78E+05	5,21E-03	18,8	2,2

Como se muestra en las tablas 4-6, el anticuerpo H4H1276S mostró unión a ANGPTL3 de macaco, ratón y rata con afinidades de unión y constantes cinéticas similares a las de la unión a ANGPTL3 humana.

5

La tabla 7 muestra la unión de anticuerpos anti-ANGPTL3 seleccionados a hANGPTL3 y mANGPTL3 a 37 °C, pH 7,4, en tampón HBS-EP. NB: No unido.

Tabla 7

Clones de Ab	Proteína	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _d (nM)	t _{1/2} (min)
H1M896N	hANGPTL3(17-460)-His	3,36E+06	5,30E-04	1,58E-10	22
	mANGPTL3(17-455)-His	3,62E+06	2,47E-03	6,82E-10	5
H4H1248P	hANGPTL3(17-460)-His	1,96E+06	1,93E-03	9,86E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	NB	NB	NB	NB
H4H1250P	hANGPTL3(17-460)-His	3,50E+06	1,13E-03	3,24E-10	10
	mANGPTL3(17-455)-His	3,18E+06	1,55E-03	4,86E-10	7
H4H1263S	hANGPTL3(17-460)-His	4,74E+06	1,81E-03	3,81E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	NB	NB	NB	NB
H4H1279P	hANGPTL3(17-460)-His	4,74E+06	1,81E-03	3,81E-10	6
	mANGPTL3(17-455)-His	2,15E+06	3,59E-04	1,67E-10	32
H4H1292P	hANGPTL3(17-460)-His	1,89E+06	1,94E-03	1,02E-09	6
	mANGPTL3(17-455)-His	3,92E+06	1,49E-03	3,80E-10	8

10

Tal como se muestra en la Tabla 7, los anticuerpos anti-hANGPTL3 se unen a la proteína de longitud completa con una marca de decahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-460)-His] a pH 7,4 y 37 °C con constantes de disociación en equilibrio calculadas ($K_D = kd/ka$) que varían entre 158 pM y 1,02 nM y hasta ANGPTL3 de ratón [mANGPTL3(17-455)-His] con K_D que varían entre 167 pM y 682 pM, excepto para H4H1248P y H4H1263S, que no mostraron unión detectable a mANGPTL3. También se muestran las semividas cinéticas ($t_{1/2}$).

15

Ejemplo 4. Estudio de competencia cruzada de Biacore para anticuerpos anti-ANGPTL3

20

Se realizaron experimentos de competencia cruzada a 25 °C en un Biacore esencialmente como se ha descrito en el ejemplo 3 anterior. En resumen, usando HBS-EP como tampón de migración, hANGPTL3 de longitud completa (es decir, restos de aminoácidos 17-460 de la SEQ ID NO: 161) con una marca de decahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; n° de catálogo 3829-AN] se capturó sobre la superficie acoplada con

anti-penta-histidina hasta que se consiguió una respuesta de unión de 64 RU. Para determinar si dos anticuerpos podían unirse simultáneamente a la ANGPTL3 capturada, los pares de anticuerpos se inyectaron secuencialmente, cada uno a 167 nM a un caudal de 4 µl/minuto durante 15 minutos, sobre la superficie, y la señal de respuesta de unión máxima (RU) se midió para cada acontecimiento de unión. Los resultados se muestran en la tabla 8 con respuesta de unión para el primer anticuerpo (mAb1), seguida de respuesta de unión del segundo anticuerpo (mAb2) en la superficie de ANGPTL3 precargada con el primer anticuerpo. Los números en **negrita** indican que los pares de anticuerpos pueden unirse a hANGPTL3 simultáneamente. Los números en *cursiva* indican que los pares de anticuerpos pueden unirse a hANGPTL3 simultáneamente cuando se añaden secuencialmente en una dirección pero no en la otra. Los corchetes indican autocompetencia.

Tabla 8

Clones de Ab	hANGPTL3 (17-460)-His capturado (RU)	Respuesta de unión (RU) al mAb1 a 25 µg/ml	Respuesta de unión (RU) al mAb2 a 25 µg/ml			
			H1M896N	H4H1250P	H4H1279P	H4H1292P
H1M896N	64 ± 4	171 ± 1,8	[-4]	-4	47	50
H4H1250P		210 ± 8,3	-4	[13]	9	8
H4H1279P		45 ± 1,8	186	213	[-3]	-1
H4H1292P		48 ± 0,7	182	220	-3	[-2]
Control negativo		81 ± 1,8	149	187	47	48

Tal como se muestra en la Tabla 8, los pares de anticuerpos H1M896N/H4H1279P y H1M896N/H4H1292P fueron capaces de unirse simultáneamente a ANGPTL3 inmovilizado, independientemente del orden de adición de los anticuerpos. H4H1250P se unió a ANGPTL3 unido previamente con H4H1279P; sin embargo, cuando se invirtió el orden de adición de anticuerpos, H4H1279P exhibió una señal de unión aproximadamente el 24 % de la respuesta máxima esperada después de que ANGPTL3 se uniera previamente con H4H1250P. De manera similar, H4H1250P se unió a ANGPTL3 unido previamente con H4H1292P; sin embargo, cuando se invirtió el orden de adición de anticuerpos, H4H1292P mostró una señal de unión de aproximadamente el 20 % de la respuesta máxima esperada después de que el ANGPTL3 se uniera previamente con H4H1250P.

Ejemplo 5. Unión del anticuerpo anti-hANGPTL3 a péptidos de espira enrollada N-terminal de ANGPTL3

Para evaluar la unión del anticuerpo anti-ANGPTL3 H4H1276S a péptidos derivados de la región de la espira enrollada N-terminal de ANGPTL3, se realizó un ensayo de unión a biosensor libre de marcador usando el sistema OCTET® RED (FortéBio, Inc.). Para la inmovilización sobre el sensor, los péptidos se marcaron con una marca de biotina N-terminal [separada por un enlazador flexible, aminoácidos "AGSSPPG" (SEQ ID NO: 171), para el Péptido 1 y el Péptido 2; y aminoácidos "GGGGS" (SEQ ID NO: 172) para el péptido 3], o una marca de biotina C-terminal [separada por un enlazador flexible, aminoácidos "GPSSGAPPPK" (SEQ ID NO: 173), para el Péptido 1 y el Péptido 2; y aminoácidos "GGGGSK" (SEQ ID NO: 174) para el péptido 3]. Las secuencias peptídicas ensayadas fueron: un péptido de control negativo, Péptido 1 marcado con biotina N-terminal (SEQ ID NO: 168; restos Arg34 a Leu66 de ANGPTL4 humana de la SEQ ID NO: 164); y péptidos derivados de la región de espira enrollada N-terminal de ANGPTL3, es decir, Péptido 2 marcado con biotina N-terminal (SEQ ID NO: 169; restos Arg36 a Leu68 de hANGPTL3 de la SEQ ID NO: 161); Péptido 2 marcado con biotina C-terminal; Péptido 3 marcado con biotina N-terminal (SEQ ID NO: 170; corresponde a los restos Glu32 a Leu57 de hANGPTL3 de la SEQ ID NO: 161); y Péptido 3 marcado con biotina C-terminal. Las secuencias peptídicas también se muestran en la figura 1. Las puntas del biosensor revestidas con estreptavidina se revistieron con los péptidos biotinilados dando como resultado 1,22-2,26 nm de unidades de respuesta de unión dependiendo del péptido. Las puntas del biosensor revestidas con péptido se sumergieron luego en pocillos que contenían 1 µM de anticuerpo anti-ANGPTL3 H4H1276S o un anticuerpo de control negativo con isotipo coincidente, y la unión se supervisó durante 2,5 minutos. La respuesta de unión de H4H1276S y el anticuerpo de control de isotipo a cada uno de los péptidos se resume en la figura 2. Se observó que H4H1276S se une a la secuencia lineal de ANGPTL3 definida por el Péptido 2 pero no a la secuencia superpuesta pero distinta definida por el Péptido 3 (véase también la figura 1). El anticuerpo de control de isotipo también sirvió como control positivo para la carga de Péptido 1 (es decir, péptido hANGPTL4) en el biosensor, dado que este anticuerpo de control de isotipo reconoce específicamente hANGPTL4. Como se muestra en la Figura 2, la unión del anticuerpo de control al Péptido 1 confirmó que el Péptido 1 estaba presente sobre la superficie del sensor y también lo estaban los otros péptidos.

Ejemplo 6. Inhibición de hANGPTL3 por anticuerpos anti-hANGPTL3 en bioensayos de LPL

La lipoproteína lipasa (LPL) desempeña un papel crítico en el metabolismo de lípidos en los seres humanos. La LPL cataliza la hidrólisis de los triglicéridos y libera los ácidos grasos para que sean metabolizados. La ANGPTL3 inhibe la actividad de la LPL causando un aumento del nivel de lípidos (Oike et al., 2005, Trends in Molecular Medicine

11(10):473-479). La región de espira enrollada N-terminal de ANGPTL3 inhibe la LPL cuando se expresa sin la región de fibrinógeno C-terminal y, por lo tanto, parece conferir su función inhibitoria. Se desarrolló un bioensayo sin células para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-ANGPTL3 para inhibir la disminución inducida por ANGPTL3 de la actividad de la LPL.

5 La inhibición de la actividad de hANGPTL3 por los anticuerpos anti-ANGPTL3 se determinó usando el ensayo de lipasa fluorométrico continuo CONFLUOLIP™ (Progen, Alemania) utilizando tres proteínas hANGPTL3: hANGPTL3 madura de longitud completa (es decir, restos de aminoácidos 17-460 de la SEQ ID NO: 161) con una marca de decahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-460)-His; R&D Systems, MN; n.º de catálogo 3829-AN], la región de espira enrollada N-terminal (es decir, los restos de aminoácidos 17-169 de la SEQ ID NO: 161) con una fusión Fc de ratón C-terminal [hANGPTL3(17-169)-mFc; SEQ ID NO: 165], y el dominio de espira enrollada N-terminal de hANGPTL3 (es decir, restos de aminoácidos 17-170 de la SEQ ID NO: 161) que contiene una marca de hexahistidina C-terminal [hANGPTL3(17-170)-His].

15 En resumen, se premezclaron LPL bovina (concentración final de 2 nM), ApoCII humana (un cofactor de LPL, concentración final de 0,23 µM) y BSA (concentración final de 2 mg/ml) en PBS. Las proteínas recombinantes hANGPTL3 se añadieron a la mezcla Apo/LPL (concentraciones finales de 80-100 nM). Las mezclas de proteínas Apo/LPL/ANGPTL3 se añadieron a continuación junto con anticuerpos anti-hANGPTL3 diluidos sucesivamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadieron 100 µl de sustrato de lipasa reconstituido, 1-trinitrofenil-amino-dodecanoil-2-pirendecanoil-3-0-hexadecil-sn-glicerol (LS-A, Progen) a 25 µl de la mezcla de anticuerpos a una placa de ensayo de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C durante dos horas. La fluorescencia se midió a 342 nm/400 nm (excitación/emisión) usando un lector de microplacas FLEXSTATION® 3 (Molecular Devices, CA). La fluorescencia es directamente proporcional a la actividad de la LPL.

25 El anticuerpo contra H4H1276S mostró inhibición de la actividad inhibitoria de hANGPTL3 contra la LPL. Primero se realizó una respuesta a dosis completa usando la proteína hANGPTL3 en el ensayo de LPL para determinar la CE₅₀ de ANGPTL3 para cada experimento, y luego se realizaron las determinaciones de CI₅₀ para el anticuerpo usando concentraciones constantes de proteína ANGPTL3, tal como se muestra en la Tabla 8. Se determinó que las concentraciones de anticuerpo requeridas para una inhibición máxima del 50 % (CI₅₀) eran 9,6 nM para 80 nM de hANGPTL3(17-460)-His, 2,9 nM para 100 nM de hANGPTL3(17-170)-His y 21 nM para 80 nM de hANGPTL3(17-169)-mFc, respectivamente. Las concentraciones de anticuerpos variaban entre 0 y 300 nM para ensayar las proteínas ANGPTL3 humanas.

35 De manera similar, H4H1276S se ensayó en el bioensayo de LPL para su capacidad para inhibir ortólogos de especies cruzadas: la región N-terminal del macaco cangrejero (restos de aminoácidos 17-170 de la SEQ ID NO: 177) expresada con una marca myc-myc-hexahistidina C-terminal [MfANGPTL3(17-170)-mmH; SEQ ID NO:167], los restos de aminoácidos de la región N-terminal del ortólogo de ratón 17-240 de la SEQ ID NO: 163 con una marca de hexahistidina C-terminal [mANGPTL3(17-240)-His; SEQ ID NO: 166], y ANGPTL3 madura de longitud completa de *Mus musculus* (es decir, los restos de aminoácidos 17-455 de la SEQ ID NO: 163) con una marca de decahistidina C-terminal [mANGPTL3(17-455)-His; R&D Systems, MN; n.º de catálogo 136-AN]. Se determinó que las CI₅₀ son 10 nM para 500 nM de MfANGPTL3(17-170)-mmH constante, 14 nM para 80 nM de mANGPTL3(17-455)-His constante, y 31 nM para 500 nM constante de mANGPTL3(17-240)-His. Las concentraciones de anticuerpos variaban entre 0 y 600 nM para ensayar las proteínas ANGPTL3 de macaco y ratón. Los resultados se resumen en la tabla 9.

45 Los anticuerpos contra la región N-terminal de la proteína homóloga ANGPTL4 también demostraron bloquear la función inhibitoria de ANGPTL4 sobre LPL (Lee et al., 2009, J. Biol. Chem. 284:13735-13745). Por lo tanto, para evaluar la posible reactividad cruzada con ANGPTL4, también se ensayó el anticuerpo anti-ANGPTL3 inhibitorio H4H1276S contra ANGPTL4 humana en el ensayo de lipasa LPL, llevado a cabo como se describió anteriormente para las proteínas ANGPTL3. Una forma recombinante de la región de espira enrollada de la ANGPTL4 humana (restos 26-148 de la SEQ ID NO: 164) con una fusión IgG2a Fc de ratón C-terminal [hANGPTL4(26-148)-mFc, SEQ ID NO: 178] exhibía una CE₅₀ en el ensayo de LPL de 0,2 nM (tabla 9). H4H1276S, ensayado a través de un intervalo de concentración de 0 - 600 nM, no bloqueó esta inhibición (NB: No unido; en la tabla 9).

Tabla 9

	ANGPTL3 (17-460)- His humana	ANGPTL3 (17-170)- His humana	ANGPTL3 (17-169)- mFc humana	ANGPTL3 (17- 170)-mmH de macaco	ANGPTL3 (17-455)- His de macaco	ANGPTL3 (17-240)- His de macaco	ANGPTL4 (26-148)- mFc humana
CE ₅₀ (nM)	50	91	16	625	33	199	0,2
ANGPTL3 constante o 4 (nM)	80	100	80	500	80	500	2
Cl ₅₀ (nM)	H4H 1276S	2,9	21	10	14	31	NB
	IgG4 cont.	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Como se ha mostrado anteriormente, H4H1276S inhibió la proteína ANGPTL3 humana (de longitud completa y N-terminal), la proteína ANGPTL3 de macaco (N-terminal) y la actividad de ANGPTL3 (longitud completa y N-terminal) de ratón en grados comparables con un intervalo de CI_{50} de aproximadamente 3-31 nM.

- 5 También se ensayó un subconjunto de anticuerpos para determinar si las combinaciones de dos anticuerpos no bloqueantes contra ANGPTL3 añadidos simultáneamente podrían bloquear la actividad inhibidora de ANGPTL3 de la LPL. Se ensayaron pares de anticuerpos para inhibir los dominios N-terminales de ANGPTL3 humana y de ratón, es decir, hANGPTL3(17-169)-mFc y mANGPTL3(17-240)-His, respectivamente. Para este ensayo, las proteínas ANGPTL3 exhibieron valores de CI_{50} para bloquear LPL de 47 nM [para hANGPTL3(17-169)-mFc] y 341 nM [para mANGPTL3(17-240)-His]. Los siguientes pares, cuando se añadieron a concentraciones finales para cada anticuerpo de al menos 200 nM, no bloquearon la inhibición de la LPL por hANGPTL3(17-169)-mFc a 80 nM o mANGPTL3(17-240)-His a 500 nM: H1M896N + H4H1279P; H4H1250P + H4H1279P; H4H1248P + H4H1292P; y H4H1263S + H4H1292P. En este mismo ensayo, H4H1276S solo bloqueó estas mismas concentraciones constantes de ANGPTL3 humano y de ratón con CI_{50} de 33 nM y 64 nM, respectivamente.

15 Ejemplo 7.1. Efecto *in vivo* del anticuerpo anti-ANGPTL3 sobre los niveles de lípidos en suero

- El efecto del anticuerpo anti-hANGPTL3, H4H1276S, sobre los niveles de lípidos en suero se determinó en ratones C57Bl/6. A los ratones se les extrajo sangre previamente 7 días antes del experimento y se colocaron en grupos de seis ratones cada uno para cada dosis de anticuerpo ensayada. Los anticuerpos se administraron a niveles de dosis de 5 mg/kg (H4H1276S) y 10 mg/kg [H4H1276S y control de hlgG4(S108P) con isotipo coincidente con especificidad irrelevante] mediante inyección subcutánea el día 0 del estudio. A los ratones se les extrajo sangre después de 4 horas de ayuno los días 1, 4, 7 y 12 después de las inyecciones de anticuerpos y los niveles de lípidos en suero (triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL, colesterol LDL y colesterol HDL) se determinaron en el suero con un sistema ADVIA® Chemistry System 1800 (Siemens). Se calcularon los promedios para cada uno de los puntos temporales para cada anticuerpo. Los resultados, expresados como (media \pm SEM) de la concentración de lípidos en suero, se muestran en las tablas 10-14.

Tabla 10

Días después de la inyección	Triglicéridos en suero (mg/dl)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	87,83	6,18	89,83	3,65	87,17	5,062
1	123,16	7,02	68,00	2,84	53,83	2,52
4	99,66	10,15	62,16	5,82	50,67	3,51
7	99,83	4,57	55,83	4,95	39,67	2,55
12	82,00	5,75	76,83	10,56	53,00	6,51

30

Tabla 11

Días después de la inyección	Colesterol total (mg/dl)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	82,50	2,11	80,33	1,15	81,33	2,14
1	87,83	1,87	71,50	5,48	63,67	3,38
4	75,00	2,58	59,50	3,51	51,00	2,98
7	83,50	1,77	67,00	1,79	61,33	2,33
12	87,83	1,82	83,00	4,30	69,33	3,22

Tabla 12

Días después de la inyección	Colesterol no HDL (mg/dl)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	41,18	0,75	38,78	0,81	40,23	1,18
1	42,18	0,55	35,75	3,05	32,70	1,94
4	36,40	1,04	29,63	2,16	27,55	1,78
7	40,82	0,75	34,67	1,83	32,02	1,68
12	41,72	0,87	39,85	2,21	35,13	1,47

Tabla 13

Días después de la inyección	Colesterol LDL (mg/dl)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	4,68	0,35	4,40	0,34	4,47	0,21
1	5,40	0,41	5,20	0,79	5,33	0,71
4	4,80	0,45	4,88	0,67	5,33	0,73
7	5,38	0,46	5,83	0,48	6,40	0,67
12	5,67	0,59	6,12	0,65	5,35	0,48

Tabla 14

Días después de la inyección	Colesterol HDL (mg/dl)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	41,32	1,57	41,55	0,90	41,10	1,37
1	45,65	1,85	35,75	2,54	30,97	2,13
4	38,60	2,26	29,87	1,62	23,45	1,66
7	42,68	1,81	32,33	1,25	29,32	1,72
12	46,12	1,94	43,15	2,52	34,20	1,99

5 Los niveles de H4H1276S circulante (Ab en suero) también se determinaron usando un ensayo ELISA convencional. En resumen, las placas se revistieron con un anticuerpo anti-Fc humano de cabra (Sigma-Aldrich) para capturar el Ab en suero. A continuación se añadió suero a las placas y se detectó el anticuerpo humano capturado por quimioluminiscencia usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Sigma-Aldrich). Los resultados, expresados como (media \pm SEM) se muestran en la tabla 15. Control: ratones que recibieron un Ab de control de isotipo coincidente.

10

Tabla 15

Días después de la inyección	Ab en suero (μ g/ml)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
1	65,00	8,05	36,38	7,57	126,23	9,96
4	59,16	4,94	29,91	4,32	86,28	6,77
7	58,23	6,02	30,86	5,11	54,24	8,96

Días después de la inyección	Ab en suero ($\mu\text{g/ml}$)					
	Ab de control (10 mg/kg)		H4H1276S (5 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
12	41,35	9,76	5,48	1,79	39,04	7,08

La administración única de H4H1276S a ratones C57Bl/6 a 10 mg/kg condujo a una reducción de ~60 % de los triglicéridos circulantes 7 días después de la administración del anticuerpo (en comparación con el control de isotipo). La administración de H4H1276S también condujo a una reducción significativa del colesterol total, el colesterol no HDL y el colesterol HDL y no tuvo ningún efecto sobre el colesterol LDL. También se observó una reducción de los niveles de lípidos, pero menos pronunciada, a 5 mg/kg en comparación con los niveles de dosis de 10 mg/kg; por ejemplo, los triglicéridos séricos se redujeron en un 44 % (en comparación con el control de isotipo) 7 días después de la administración del anticuerpo.

10 Ejemplo 7.2. Efecto *in vivo* del anticuerpos anti-ANGPTL3 sobre los niveles de lípidos en suero

La evaluación de los efectos *in vivo* de los anticuerpos anti-hANGPTL3, H4H1276S y el anticuerpo comparador 4.9.1 sobre los niveles de lípidos en suero se realizó en ratones C57Bl/6. El anticuerpo 4.9.1 se preparó basándose en las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID No: 24 (VH) y la SEQ ID No: 32 (VL) como se divulga en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2008/0177045 y como un isotipo de IgG1 de ratón. A los ratones se les extrajo sangre previamente 7 días antes del experimento y se colocaron en grupos de seis ratones por grupo. Los anticuerpos H4H1276S, 4.9.1, y controles negativos de isotipo coincidente (IgG4 humana y IgG1 de ratón, respectivamente) con especificidad irrelevante se administraron a una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea el día 0 del estudio. A los ratones se les extrajo sangre después de 4 horas de ayuno los días 1, 7, 11 y 20 después de la inyección de anticuerpos y los niveles de lípidos en suero (triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL, colesterol LDL y colesterol HDL) se determinaron en el suero usando un sistema ADVIA® Chemistry System 1800 (Siemens). Se calcularon las concentraciones de lípido promedio para cada uno de los puntos temporales para cada anticuerpo. Los resultados, expresados como (media \pm SEM) de la concentración de lípidos en suero, se muestran en las tablas 16-20.

Tabla 16

Días después de la inyección	Triglicéridos en suero (mg/dl)							
	Control (IgG4)		H4H1276S		Control (IgG1)		4.9.1	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	109,16	9,05	109,16	6,44	112,80	6,87	109,17	7,24
1	81,67	6,76	46,00	3,59	95,20	8,92	41,83	2,42
7	95,67	5,42	49,67	3,86	101,80	7,55	96,00	3,70
11	100,83	6,20	51,00	5,89	117,00	6,00	92,00	4,50
20	82,17	4,36	72,67	3,47	79,40	6,59	73,83	5,03

Tabla 17

Días después de la inyección	Colesterol total (mg/dl)							
	Control (IgG4)		H4H1276S		Control (IgG1)		4.9.1	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	80,81	0,95	80,92	3,05	80,32	2,84	79,37	2,76
1	82,82	2,11	67,33	3,60	82,98	2,17	71,35	1,82
7	79,20	1,81	63,58	3,98	85,02	7,27	82,07	4,36
11	89,97	3,18	69,02	2,11	83,92	2,49	84,58	1,08
20	92,43	1,10	80,17	3,20	87,47	2,58	88,40	2,84

Tabla 18

Días después de la inyección	Colesterol no HDL (mg/dl)							
	Control (IgG4)		H4H1276S		Control (IgG1)		4.9.1	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	42,44	1,18	42,87	1,03	43,20	2,44	41,73	1,40
1	40,85	1,48	35,33	1,79	40,68	0,87	36,97	1,49
7	39,03	1,04	33,72	2,86	43,30	4,35	40,47	2,35
11	44,68	1,93	35,18	1,64	40,28	0,95	41,38	1,05
20	47,40	0,67	42,10	1,51	44,72	1,66	44,40	1,57

Tabla 19

Días después de la inyección	Colesterol LDL (mg/dl)							
	Control (IgG4)		H4H1276S		Control (IgG1)		4.9.1	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	3,93	0,07	4,20	0,26	4,38	0,26	4,20	0,18
1	3,95	0,28	4,25	0,37	3,92	0,17	4,62	0,37
7	3,75	0,14	5,25	1,08	5,76	1,61	4,57	0,73
11	5,05	0,26	5,47	0,23	4,88	0,27	4,78	0,23
20	5,72	0,34	4,95	0,32	4,97	0,28	5,65	0,46

5

Tabla 20

Días después de la inyección	Colesterol HDL (mg/dl)							
	Control (IgG4)		H4H1276S		Control (IgG1)		4.9.1	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
-7	38,37	0,95	38,00	2,27	37,12	1,88	37,63	1,52
1	41,97	1,32	32,00	1,89	42,30	2,09	34,38	0,85
7	40,17	0,93	29,87	1,23	41,72	2,97	41,60	2,47
11	45,28	1,80	33,83	1,15	43,64	1,70	43,20	1,57
20	45,03	0,75	38,07	1,79	42,75	1,69	44,00	1,83

Una dosis única de 10 mg/kg de H4H1276S en ratones C57Bl/6 dio como resultado una reducción de los niveles de triglicéridos en plasma en comparación con el control de isotipo los días 1, 7, 11 y 20 después de la inyección de anticuerpo; y este efecto fue más sostenido en comparación con un único tratamiento al mismo nivel de dosis con el comparador 4.9.1 (tabla 16). La administración de H4H1276S también condujo a una reducción del colesterol total (tabla 17) y el colesterol HDL (tabla 20) en ratones C57Bl/6.

10

Ejemplo 8. Efecto *in vivo* de H4H1276S sobre los niveles de lípidos en suero en ratones ApoE^{-/-} hiperlipidémicos

15

El efecto del anticuerpo anti-hANGPTL3, H4H1276S, sobre los niveles de lípidos en suero se determinó en ratones apoE^{-/-}. Estos ratones son hiperlipidémicos y la mayoría de su colesterol circulante se encuentra en forma de VLDL y LDL. A los ratones se les extrajo sangre previamente 7 días antes del experimento y se colocaron en grupos de seis ratones por grupo. Los anticuerpos, H4H1276S y un control (hIgG4) con isotipo coincidente con especificidad irrelevante, se administraron a una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea el día 0 del estudio. A los ratones se les extrajo sangre después de 4 horas de ayuno los días 1, 4, 7 y 11 después de la inyección de anticuerpos; y los niveles de lípidos en suero (triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL, colesterol LDL y colesterol HDL) se determinaron en el suero usando un sistema ADVIA® Chemistry System 1800 (Siemens). Se calcularon las concentraciones de lípido promedio para cada uno de los puntos temporales para cada grupo tratado con anticuerpo. Los resultados, expresados como (media ± SEM) de la concentración de lípidos en suero, se muestran en las tablas

20

25

21-25.

Tabla 21

Días después de la inyección	Triglicéridos en suero (mg/dl)			
	Control (hlgG4)		H4H1276S	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	134,17	11,81	141,67	17,14
1	156,33	19,06	61,33	3,66
4	181,00	7,70	70,50	4,46
7	190,67	27,65	52,50	6,22
11	170,00	28,85	133,00	13,56

Tabla 22

Días después de la inyección	Colesterol total (mg/dl)			
	Control (hlgG4)		H4H1276S	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	450,67	25,68	479,33	13,76
1	497,50	37,77	386,33	28,59
4	395,00	14,37	281,20	20,83
7	447,33	22,18	295,50	12,86
11	463,80	36,01	398,03	23,13

Tabla 23

Días después de la inyección	Colesterol no HDL (mg/dl)			
	Control (hlgG4)		H4H1276S	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	435,87	25,59	464,53	13,97
1	476,30	37,29	371,25	28,65
4	375,61	14,51	266,26	21,19
7	427,66	21,45	280,75	12,55
11	442,27	34,19	379,55	22,31

Tabla 24

Días después de la inyección	Colesterol LDL (mg/dl)			
	Control (hlgG4)		H4H1276S	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	14,27	1,63	14,87	0,90
1	17,42	2,94	11,23	1,81
4	10,28	1,52	6,62	0,83
7	11,82	1,40	6,32	0,45
11	13,90	2,54	10,21	1,14

Tabla 25

Días después de la inyección	Colesterol HDL (mg/dl)			
	Control (hlgG4)		H4H1276S	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	14,80	0,37	14,80	0,54
1	21,20	1,00	15,08	0,53
4	19,33	0,94	14,53	0,75
7	19,77	0,78	14,58	0,72
11	21,53	1,89	18,48	1,00

La administración única de H4H1276S a ratones apoE^{-/-} a 10 mg/kg condujo a una reducción (media) de ~72% de los triglicéridos circulantes (tabla 21) y una reducción (media) de ~46% del colesterol LDL (tabla 24) 7 días después de la administración del anticuerpo (en comparación con el Ab de control de isotipo coincidente, es decir, hlgG4). La administración de H4H1276S también condujo a una reducción del colesterol total (tabla 22) y el colesterol no HDL (tabla 23).

Los niveles de H4H1276S circulante (Ab en suero) también se determinaron usando un ensayo ELISA convencional. En resumen, las placas se revistieron con un anticuerpo anti-Fc humano de cabra (Sigma-Aldrich) para capturar el Ab en suero. A continuación se añadió suero a las placas y se detectaron los anticuerpos capturados por quimioluminiscencia usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Sigma-Aldrich). Los resultados, expresados como (media ± SEM), se muestran en la tabla 26 (control: ratones que recibieron un Ab de control de isotipo coincidente, es decir, hlgG4).

Tabla 26

Días después de la inyección	Ab en suero (µg/ml)			
	Control (hlgG4) (10 mg/kg)		H4H1276S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
1	89,98	16,70	115,29	19,75
4	67,18	2,38	86,61	5,32
7	58,52	2,00	39,85	6,91
12	43,26	1,76	3,18	2,64

Ejemplo 9. Efecto *in vivo* de H4H1276S sobre los niveles de lípidos circulantes en ratones Ldlr^{-/-} hiperlipidémicos

El efecto del anticuerpo anti-hANGPTL3, H4H1276S, sobre los niveles de lípidos en suero se determinó en ratones Ldlr^{-/-}. Estos ratones son hiperlipidémicos con una mayoría de colesterol circulante encontrada en forma de LDL debido a la carencia de LDLR, el principal receptor para la captación de colesterol LDL.

A los ratones se les extrajo sangre previamente 7 días antes del experimento y se colocaron en grupos de seis ratones. Los anticuerpos, H4H1276S y control negativo (hlgG4) de isotipo coincidente, se administraron a una dosis de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea el día 0 del estudio. A los ratones se les extrajo sangre después de 4 horas de ayuno los días 1, 4, 7 y 11 después de la inyección de anticuerpos y los niveles de lípidos en suero (triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL, colesterol LDL y colesterol HDL) se determinaron usando un analizador de química clínica ADVIA® Chemistry System 1800 (Siemens). Se calcularon los promedios para cada punto temporal para cada anticuerpo. Los resultados, expresados como (media ± SEM) de la concentración de lípidos en suero (triglicéridos, colesterol total, colesterol no HDL, colesterol LDL y colesterol HDL), se muestran en las tablas 27-31, respectivamente. (Control = ratones que recibieron un anticuerpo de control de isotipo coincidente).

Tabla 27. Triglicéridos en suero (mg/dl)

Días después de la inyección	Anticuerpo			
	Control (10 mg/kg)		H4H1726S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	114,50	11,08	110,83	6,89
1	131,50	6,18	74,17	3,30
4	112,67	8,94	68,00	3,91
7	136,67	11,55	92,67	12,16
11	142,33	7,10	95,83	8,67

Tabla 28. Colesterol total (mg/dl)

Días después de la inyección	Anticuerpo			
	Control (10 mg/kg)		H4H1726S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	237,95	7,33	236,99	5,68
1	241,97	10,58	206,98	9,68
4	229,88	7,61	172,96	4,49
7	234,74	10,49	176,28	7,47
11	251,87	18,82	201,73	10,12

Tabla 29. Colesterol no HDL (mg/dl)

Días después de la inyección	Anticuerpo			
	Control (10 mg/kg)		H4H1726S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	180,81	7,47	182,79	5,93
1	184,35	10,22	155,93	8,74
4	175,13	7,26	130,79	4,66
7	174,84	9,26	126,56	6,63
11	190,00	17,07	145,43	7,34

Tabla 30. Colesterol LDL (mg/dl)

Días después de la inyección	Anticuerpo			
	Control (10 mg/kg)		H4H1726S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	62,75	2,18	62,75	1,81
1	63,25	2,40	53,82	4,09
4	60,97	3,14	49,65	2,72
7	59,52	2,99	46,05	2,13
11	63,23	3,07	54,28	1,67

Tabla 31. Colesterol HDL (mg/dl)

Días después de la inyección	Anticuerpo			
	Control (10 mg/kg)		H4H1726S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
-7	57,13	1,56	54,20	1,89
1	57,62	0,88	51,05	0,98
4	54,75	2,23	42,17	1,89
7	59,90	2,51	49,72	2,35
11	61,87	2,48	56,30	3,43

- 5 Como se muestra en las tablas 27-31, la administración de H4H1726S a ratones *Ldlr*^{-/-} condujo a una reducción significativa de los triglicéridos en plasma con una reducción máxima observada del 44 % (basándose en los valores medios). También se observaron reducciones significativas del colesterol LDL (hasta un 23 %), así como el colesterol total, el colesterol no HDL y el colesterol HDL, en sujetos tratados con H4H1726S. La reducción del colesterol LDL en ratones deficientes para el principal receptor de la captación de colesterol LDL (LDLR) sugiere un mecanismo independiente de LDLR para la reducción del colesterol LDL por inhibición de ANGPTL3.
- 10 Los niveles de H4H1726S circulante (Ab en suero) también se determinaron usando un ensayo ELISA convencional. En resumen, las placas se revistieron con un anticuerpo anti-Fc humano de cabra (Sigma-Aldrich) para capturar el Ab en suero. A continuación se añadió suero a las placas y se detectaron los anticuerpos capturados por quimioluminiscencia usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Sigma-Aldrich). Los resultados, expresados como (media \pm SEM) se muestran en la tabla 32. (Control = ratones que recibieron un anticuerpo de control de isotipo coincidente).
- 15

Tabla 32. Ab en suero (μ g/ml)

Días después de la inyección	Anticuerpo			
	Control (10 mg/kg)		H4H1726S (10 mg/kg)	
	Media	SEM	Media	SEM
1	44,59	1,95	58,79	5,95
4	42,28	6,12	47,21	10,24
7	41,76	3,87	28,88	5,97
11	37,25	6,85	21,02	4,86

- 20 Tal como se muestra en la Tabla 32, los niveles séricos de H4H1726S disminuyeron a aproximadamente 21 μ g/ml el día 11 después de la inyección a los ratones con 10 mg/kg de anticuerpo.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Anticuerpos anti-ANGPTL3 y usos de los mismos
- <130> 6500A-WO
- 30 <140> Por asignar
- <141> Presentado en este documento
- <150> 61/498, 518
- 35 <151> 17/06/2011
- <150> 61/578, 309
- <151> 21/12/2011
- 40 <160> 194

ES 2 699 499 T3

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

5 <210> 1
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 1

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt cgcaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagtggga 300
gctactactt tctactacta ctacgggatg gacgtctggg gcccaaggac cacggtcacc 360
gtctcctca                                     369
  
```

15 <210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1                    5                    10                    15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20                    25                    30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35                    40                    45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50                    55                    60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65                    70                    75                    80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85                    90
Ala Lys Val Gly Ala Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100                   105                   110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115                   120
  
```

25 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético
 <400> 3

ggattcacct tcagtagtta tggc 24

35 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 699 499 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 5 <400> 4

 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5
 10 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Sintético

 <400> 5
 atatcatatg atggaagtaa taaa 24
 20 <210> 6
 <211> 8

 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético
 30 <400> 6

 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

 <210> 7
 35 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Sintético

 <400> 7
 gcgaaagtgg gagctactac ttctactac tactacggta tggacgtc 48
 45 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Sintético

 <400> 8

 Ala Lys Val Gly Ala Thr Thr Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15
 55 <210> 9
 <211> 321
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 699 499 T3

5 <210> 13
<211> 9
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

10 <400> 13
gctgcatcc 9

15 <210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

20 <400> 14

Ala Ala Ser
1

25 <210> 15
<211> 27
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 15
caaaaggcta acagttccc attcact 27

35 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 16

Gln Lys Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

45 <210> 17
<211> 369
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

55 <400> 17

ES 2 699 499 T3

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctggggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcaaagtg atggaagtaa taaatactat 180
gtagattccg tgaagggccg attcaccatg ggagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctccaaatga acagcctgag agttgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaggggct 300
ggaactcttt actactacta ctacggtatg gacgtctggg gcccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369
    
```

5 <210> 18
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 18

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Gly Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Gly Ala Gly Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
    
```

```

          100          105          110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120
    
```

15 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 19
 ggattcacct tcagtagcta tggc 24

25 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 20

35 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
 1 5

ES 2 699 499 T3

5 <210> 21
 <211> 24
 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 21
 atatcaaatg atggaagtaa taaa 24

15 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

20 <400> 22

Ile Ser Asn Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

25 <210> 23
 <211> 48
 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 23
 gcgaaagggg ctggaactct ttactactac tactacggta tggacgtc 48

35 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintético

<400> 24

Ala Lys Gly Ala Gly Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

45 <210> 25
 <211> 321

50 < 212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

55 <400> 25

ES 2 699 499 T3

```

gacatccaga tgacccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaaa cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc aagtattagt agctgggttg cctgggtatca acaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagttcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc tgggacagaa ttcactctca ccatcaccag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tacaatattt attcgtggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

```

5 <210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 26

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asn Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
           20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile
           35           40           45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
           65           70           75           80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Ser Trp
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

15 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 27
 caaagtatta gtagctgg 18

25 <210> 28
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 28

35 Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 1 5

40 <210> 29
 <211> 9
 <212> ADN

ES 2 699 499 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 29
aaggcgtct 9

10 <210> 30
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 30

20 Lys Ala Ser
1

<210> 31
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

30 <400> 31
caacagtaca atattattc gtggacg 27

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintético

40 <400> 32

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Ser Trp Thr
1 5

45 <210> 33
<211> 372
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintético

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atatcatttg atagaggtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtgat 240
ctgcaaataga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagggggg 300
ggttcgggga ctttctacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggctc 360
accgtctcct ca 372

ES 2 699 499 T3

5
 <210> 34
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10
 <400> 34

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Ala	Val	Ile	Ser	Phe	Asp	Arg	Gly	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
			100					105					110		
Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser				
		115						120							

15
 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

20
 <400> 35
 ggattcacct tcagtaccta tggc 24

25
 <210> 36
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintético

<400> 36

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Gly
1				5			

35
 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Sintético

45
 <400> 37
 atatcattg atagaggtaa taaa 24

ES 2 699 499 T3

5
 <210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10
 <400> 38

Ile Ser Phe Asp Arg Gly Asn Lys
 1 5

15
 <210> 39
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

20
 <400> 39
 gcgaaagggg ggggttcggg gactttctac tactactacg gtatggacgt c 51

25
 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintético

<400> 40

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

35
 <210> 41
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Sintético

45
 <400> 41

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaaa cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggatttagc agctggtag cctggtatca ccagaaacca 120
 gggaaagtcc ctaaggtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggatatcaa acga 324

50
 <210> 42
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 699 499 T3

<223> Sintético

<400> 42

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asn	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Val	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ala	Asn	Ser	Phe	Pro	Phe
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

5

<210> 43

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 43

cagggtatta gcagctgg 18

<210> 44

<211> 6

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

25 <400> 44

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1

5

30 <210> 45

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Sintético

<400> 45

gctgcatcc 9

40 <210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Sintético

ES 2 699 499 T3

<400> 46

Ala Ala Ser
1

5 <210> 47
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 47
caacaggcta acagttccc attcact 27

15 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

25 <400> 48

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

30 <210> 49
<211> 375
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintético

<400> 49

```

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaaac cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtc ctgcttgaa ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatgattatg cagtgtctgt gagaggtcga ataaccatca acccagacac atccaataac 240
cagttctccc tacatctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggcgatgta ttactgtgca 300
agagacaagg gtctaacagc tcgtccgacc tactttgact actggggcca gggaaacctg 360
gtcaccgtct cctca 375
    
```

40 <210> 50
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 50

ES 2 699 499 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn
			20					25					30		
Ser	Pro	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Ser	Lys	Trp	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Ala
	50					55					60				
Val	Ser	Val	Arg	Gly	Arg	Ile	Thr	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn
65					70					75					80
Gln	Phe	Ser	Leu	His	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Met
				85					90					95	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Lys	Gly	Leu	Thr	Ala	Arg	Pro	Thr	Tyr	Phe
			100					105					110		
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

<210> 51
<211> 30

5

< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

10

<400> 51
ggggacagtg tctctagcaa cagtctgct 30

15

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Sintético

<400> 52

			Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Pro	Ala
			1				5					10

25

<210> 53
<211> 27
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Sintético

35

<400> 53
acatactaca ggtccaagtg gtataat 27

40

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Sintético

ES 2 699 499 T3

<400> 54

Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
1 5

5 <210> 55
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 55
gcaagagaca agggctaac agctcgtccg acctactttg actac 45

15 <210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

25 <400> 56

Ala Arg Asp Lys Gly Leu Thr Ala Arg Pro Thr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

30 <210> 57
<211> 326
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintético

<400> 57

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattaat tactggttg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcccct tatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gacgatttta caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctccgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaac 326

40 <210> 58
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 58

ES 2 699 499 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Asn	Tyr	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Asp	Asp	Phe	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Ser	Pro
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

5 <210> 59
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 59
 cagagtatta attactgg 18

15 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 60

Gln Ser Ile Asn Tyr Trp
 1 5

25 <210> 61
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 61
 aaggcgtct 9

40 <210> 62
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 62

ES 2 699 499 T3

Lys Ala Ser
1

5 <210> 63
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 63
caacagtata atagttattc tccgacg 27

15 <210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 64

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Pro Thr
1 5

25 <210> 65
<211> 378
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 65

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgatacagc ctgggggggct cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcgat gattatgcca tgaactgggt ccgtcaaggt 120
ccagggaagg gtctggagtg ggtctctgcc ataagtgggt atggcggtag cacatactat 180
gcagactcgg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acagcaaaaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgcctttt tttactgtgc aaaagatctc 300
cgtaatacga tttttggagt ggttattccc gatgcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttca 378
```

40 <210> 66
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 66

ES 2 699 499 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Gly Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Leu Arg Asn Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Pro Asp Ala
 100 105 110
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

5 <210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 67
 ggattcacct tcgatgatta tgcc 24

15 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
 1 5

25 <210> 69
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 69
 ataagtgtg atggcgtag caca 24

40 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 70

ES 2 699 499 T3

Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr
 1 5

5 <210> 71
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <400> 71
 gcaaaagatc tccgtaatac gatttttga gtggttattc cccgatgctt tgatatac 57

15 <210> 72
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

20 <400> 72

Ala Lys Asp Leu Arg Asn Thr Ile Phe Gly Val Val Ile Pro Asp Ala
 1 5 10 15
 Phe Asp Ile

25 <210> 73
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 73

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gagcattagg agctggttgg cctggatatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaactcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tataatagtt attcgtacac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acga 324

35 <210> 74
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 74

ES 2 699 499 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Arg	Ser	Trp
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Ser	Tyr
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

5 <210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 75
 cagagcatta ggagctgg 18

15 <210> 76
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 76

Gln Ser Ile Arg Ser Trp
 1 5

25 <210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 77
 aaggcgtct 9

<210> 78

40 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 78

ES 2 699 499 T3

Lys Ala Ser
1

5 <210> 79
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 79
caacaatata atagttattc gtacact 27

15 <210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
1 5

25 <210> 81
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 81

caggtgcagc	tggtggagtc	ggggggaggc	ttggtcaagc	ctggagggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	gactactaca	tgagctggat	ccgtcaggct	120
ccagggaaag	ggctggagtg	ggtttcatac	attggtagta	gtggtgtcaa	catgtactac	180
gcagactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagggaca	acgccaagaa	ttcattatat	240
ctggaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgttt	attactgtgc	gagagactct	300
tcccaactgg	gttttgacta	ctgggggccg	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctca	354

40 <210> 82
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 82

ES 2 699 499 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Val Asn Met Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 83
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 83
 ggattcactt tcagtgacta ctac 24

15 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

25 <210> 85
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 85
 attggtagta gtggtgcaaa catg 24

40 <210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 86

ES 2 699 499 T3

Ile Gly Ser Ser Gly Val Asn Met
 1 5

5 <210> 87
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 87
 gcgagagact cttccaact gggtttgac tac 33

15 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 88

Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

25 <210> 89
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 89

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc ggacaagtca gaatattatc aactttttaa attggtatca acagaaacct 120
 ggaaggccc ctaaactcct gatctatact acttccactt taaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctct ccatcaatag tctacaacct 240
 gaagatthtg caacttactt ctgtcaacag acttacagta atccactcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

40 <210> 90
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 90

ES 2 699 499 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asn Ile Ile Asn Phe
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Thr Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Leu
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100           105

```

5 <210> 91
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 91
 cagaatatta tcaactt 18

15 <210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 92

```

Gln Asn Ile Ile Asn Phe
 1           5

```

25 <210> 93
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 93
 actactcc 9

40 <210> 94
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 94

ES 2 699 499 T3

Thr Thr Ser
1

5 <210> 95
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 95
caacagactt acagtaatcc actcact 27

15 <210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 96

Gln Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 97
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 97

```
gaggtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aattatggca tgcactgggt cgcagggt 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt gtttggatg atggagataa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatatt 300
atcacatctc gcccgacttt ggactactgg ggccagggaa ccctggtcac tgtctcctca 360
```

40 <210> 98
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

nn

<220>
<223> Sintético

45 <400> 98

ES 2 699 499 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Val	Val	Trp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Asp	Ile	Thr	Ser	Arg	Pro	Thr	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100				105						110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

5 <210> 99
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 99
 ggattcacct tcagtaatta tggc 24

15 <210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly
 1 5

25 <210> 101
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 101
 gtttggtatg atggagataa taaa 24

40 <210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 102

ES 2 699 499 T3

Val Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Lys
1 5

5
<210> 103
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Sintético

<400> 103
gcgagagata ttatcacatc tcgcccgact ttggactac 39

15
<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Sintético

<400> 104

Ala Arg Asp Ile Ile Thr Ser Arg Pro Thr Leu Asp Tyr
1 5 10

25
<210> 105
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Sintético

35
<400> 105

```

gacatccagt tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgct gggccagtc gggcattaac agttatctag cctgggatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
gtagatcttg caacttatta ctgtcaacag cttaatatgt acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324
    
```

40
<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Sintético

<400> 106

ES 2 699 499 T3

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Trp	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Asn	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Pro	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Val	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Leu	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

5 <210> 107
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 107
 cagggcatta acagttat 18

15 <210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 108

Gln Gly Ile Asn Ser Tyr
 1 5

25 <210> 109
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 109
 cctgcatcc 9

40 <210> 110
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 110

ES 2 699 499 T3

Pro Ala Ser
1

5 <210> 111
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 111
caacagctta atagttaccc gctcact 27

15 <210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 112

Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 113
<211> 354

30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 113

caggtgcagc	tgggtggagtc	gggggggaggc	ttgggtcaagc	ctggaggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	gactactaca	tgagctggat	ccgccaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtttcatac	attagtagta	gtggtagtac	catatactac	180
gcagactctg	tgaagggccg	attcaccata	tccagggaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagattct	300
tcccaactgg	gttttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctca	354

40 <210> 114
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 114

ES 2 699 499 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 115
 ggattcacct tcagtgacta ctac 24

15 <210> 116
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 116

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

25 <210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 117
 attagtagta gtgtagtac cata 24

40 <210> 118
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

ES 2 699 499 T3

<400> 118

Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile
 1 5

5 <210> 119
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 119
 gcgagagatt ctccaact gggtttgac tac 33

15 <210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

25 <400> 120

Ala Arg Asp Ser Ser Gln Leu Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 121
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<400> 121

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattatc agcttttttaa attggtatca gcagaaacca 120
gggaaggccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctacaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag acttacagta atccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggaaatcaa acga 324
```

40 <210> 122
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 122

ES 2 699 499 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Phe
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Thr	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Tyr	Ser	Asn	Pro	Leu
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

5 <210> 123
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 123
 cagagcatta tcagcttt 18

15 <210> 124
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 124

Gln Ser Ile Ile Ser Phe
 1 5

25 <210> 125
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 125
 actgcatcc 9

40 <210> 126
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 126

ES 2 699 499 T3

Thr Ala Ser
1

5 <210> 127
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 127
caacagactt acagtaatcc gctcact 27

15 <210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 128

Gln Gln Thr Tyr Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 129
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 129

```

cagggtgcagc tgggtacagtc tggacctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgagggtc 60
tcctgtaagg cttctgggta ccttagtgac tttattatca cctgggtgcg acaggcccct 120
ggacaagggc ttgagtggat gggatggatc agcacttaca gtggtgacac agactctgca 180
ccgaagttcc agggcagagt caccatgacc acagacacat ccacgactac agtcttcttg 240
gaactgagga gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt attgtgcgag agggcggctg 300
tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342
    
```

40 <210> 130
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 130

ES 2 699 499 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Arg	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Asp	Phe	Ile
			20					25					30		
Ile	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
		35					40					45			
Trp	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ser	Gly	Asp	Thr	Asp	Ser	Ala	Pro	Lys	Phe	Gln
	50					55					60				
Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Val	Phe	Leu
65					70					75					80
Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Arg	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
			100					105					110		
Ser	Ser														

5 <210> 131
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 131
 ggttaccta gtagcttat t 21

15 <210> 132
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 132

Gly Tyr Leu Ser Asp Phe Ile
 1 5

25 <210> 133
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 133
 atcagcactt acagtggatg caca 24

40 <210> 134
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 134

ES 2 699 499 T3

Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr
 1 5

5 <210> 135
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 135
 gcgagagggc ggctgttga ctac 24

15 <210> 136
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 136

Ala Arg Gly Arg Leu Phe Asp Tyr
 1 5

25 <210> 137
 <211> 339
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 137

```

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120
tttcaacaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac 180
tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaggtag aactgggccg 300
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacga 339
  
```

40 <210> 138
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 138

ES 2 699 499 T3

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1          5          10          15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
      20          25          30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
      35          40          45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
      50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
      85          90          95
Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100          105          110
Arg

```

<210> 139

5 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 139
 caaagcctcg tatacagtga tggaacacc tac 33

15 <210> 140
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 140

```

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

```

25 <210> 141
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 141
 aaggttct 9

40 <210> 142
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 142

ES 2 699 499 T3

Lys Val Ser
1

5 <210> 143
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 143
atgcaaggta cacactggcc gtacact 27

15 <210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 144

Met Gln Gly Thr His Trp Pro Tyr Thr
1 5

25 <210> 145
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 145

cagggtgcagc	tgggtggagtc	tgggggagtc	tcgggtcaagc	ctggaggggtc	cctgcgactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	caccttcagt	gactactaca	tgagctggat	ccgccaggcg	120
ccaggggaagg	gactggagtg	ggtttcgtac	attggtagta	gtggtactaa	tgactactac	180
gcagactctg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagggaca	acgccaagaa	ctcactgtat	240
cttcaaatgg	acagcctgag	agccgaggac	acggccgtct	attactgtgc	gagagattct	300
tcccaaatgg	gttttgacta	ctggggccag	ggaaccctgg	tcactgtctc	ctca	354

40 <210> 146
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 146

ES 2 699 499 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Ser Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Thr Asn Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ser Ser Gln Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 147
 ggattcacct tcagtgacta ctac 24

15 <210> 148
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 148

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
 1 5

25 <210> 149
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 149
 attgtagta gtggtactaa tgac 24

40 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 150

ES 2 699 499 T3

Ile Gly Ser Ser Gly Thr Asn Asp
1 5

5 <210> 151
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 151
gcgagagatt ctcccaaat gggtttgac tac 33

15 <210> 152
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 152

Ala Arg Asp Ser Ser Gln Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 153
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 153

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtgggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaacattatc aactttttaa attggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctcagctcct gatctatggt gcagccagct tgcagagtgg ggtcccatca 180
aggttcactg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaggatttcg caacttacta ctgtcaacag acttacacta acccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acga 324
    
```

40 <210> 154
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético

<400> 154

ES 2 699 499 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Ile Asn Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Val Ala Ala Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 155
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 155
 cagaacatta tcaacttt 18

15 <210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 156

Gln Asn Ile Ile Asn Phe
 1 5

25 <210> 157
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 157
 gttgcagcc 9

<210> 158
 <211> 3

40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 158

ES 2 699 499 T3

Val Ala Ala
1

5 <210> 159
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 159
caacagactt acactaacc gctcact 27

15 <210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético

<400> 160

Gln Gln Thr Tyr Thr Asn Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 161
<211> 460
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 161

ES 2 699 499 T3

Met Phe Thr Ile Lys Leu Leu Leu Phe Ile Val Pro Leu Val Ile Ser
1 5 10 15
Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
20 25 30
Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
35 40 45
Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
50 55 60
Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
65 70 75 80
Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
85 90 95
Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
100 105 110
Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
115 120 125
Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
130 135 140
Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
145 150 155 160
Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Lys Gln Asp Asn Ser Ile Lys
165 170 175
Asp Leu Leu Gln Thr Val Glu Asp Gln Tyr Lys Gln Leu Asn Gln Gln
180 185 190
His Ser Gln Ile Lys Glu Ile Glu Asn Gln Leu Arg Arg Thr Ser Ile
195 200 205
Gln Glu Pro Thr Glu Ile Ser Leu Ser Ser Lys Pro Arg Ala Pro Arg
210 215 220
Thr Thr Pro Phe Leu Gln Leu Asn Glu Ile Arg Asn Val Lys His Asp
225 230 235 240
Gly Ile Pro Ala Glu Cys Thr Thr Ile Tyr Asn Arg Gly Glu His Thr
245 250 255
Ser Gly Met Tyr Ala Ile Arg Pro Ser Asn Ser Gln Val Phe His Val
260 265 270
Tyr Cys Asp Val Ile Ser Gly Ser Pro Trp Thr Leu Ile Gln His Arg
275 280 285
Ile Asp Gly Ser Gln Asn Phe Asn Glu Thr Trp Glu Asn Tyr Lys Tyr
290 295 300
Gly Phe Gly Arg Leu Asp Gly Glu Phe Trp Leu Gly Leu Glu Lys Ile
305 310 315 320
Tyr Ser Ile Val Lys Gln Ser Asn Tyr Val Leu Arg Ile Glu Leu Glu
325 330 335
Asp Trp Lys Asp Asn Lys His Tyr Ile Glu Tyr Ser Phe Tyr Leu Gly
340 345 350
Asn His Glu Thr Asn Tyr Thr Leu His Leu Val Ala Ile Thr Gly Asn
355 360 365
Val Pro Asn Ala Ile Pro Glu Asn Lys Asp Leu Val Phe Ser Thr Trp
370 375 380
Asp His Lys Ala Lys Gly His Phe Asn Cys Pro Glu Gly Tyr Ser Gly
385 390 395 400
Gly Trp Trp Trp His Asp Glu Cys Gly Glu Asn Asn Leu Asn Gly Lys
405 410 415
Tyr Asn Lys Pro Arg Ala Lys Ser Lys Pro Glu Arg Arg Arg Gly Leu
420 425 430
Ser Trp Lys Ser Gln Asn Gly Arg Leu Tyr Ser Ile Lys Ser Thr Lys
435 440 445
Met Leu Ile His Pro Thr Asp Ser Glu Ser Phe Glu
450 455 460

ES 2 699 499 T3

<210> 162
 <211> 1383
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 162

```

atgttcacaa ttaagctcct tctttttatt gttcctctag ttatttcctc cagaattgat 60
caagacaatt catcatttga ttctctatct ccagagccaa aatcaagatt tgctatgtta 120
gacgatgtaa aaatttttagc caatggcctc cttcagttgg gacatgggtct taaagacttt 180
gtccataaga cgaagggcca aattaatgac atattttcaaa aactcaacat atttgatcag 240
tctttttatg atctatcgct gcaaaccagt gaaatcaaag aagaagaaaa ggaactgaga 300
agaactacat ataaactaca agtcaaaaaa gaagaggtaa agaataatgtc acttgaactc 360
aactcaaaac ttgaaagcct cctagaagaa aaaattctac ttcaacaaaa agtgaaatat 420
ttagaagagc aactaactaa ctttaattcaa aatcaacctg aaactccaga acaccagaa 480
gtaacttcac ttaaaacttt tgtagaaaaa caagataata gcatcaaaga ccttctccag 540
accgtggaag accaatataa acaattaaac caacagcata gtcaaataaa agaaatagaa 600
aatcagctca gaaggactag tattcaagaa cccacagaaa tttctctatc ttccaagcca 660
agagcaccaa gaactactcc ctttcttcag ttgaatgaaa taagaaatgt aaaacatgat 720
ggcattcctg ctgaatgtac caccatttat aacagaggtg aacatacaag tggcatgtat 780
gccatcagac ccagcaactc tcaagttttt catgtctact gtgatgttat atcaggtagt 840
ccatggacat taattcaaca tcgaatagat ggatcacaaa acttcaatga aacgtgggag 900
aactacaaat atggttttgg gaggcttgat ggagaatttt ggttgggcct agagaagata 960
tactccatag tgaagcaatc taattatggt ttacgaattg agttggaaga ctggaaagac
1020
aacaacatt atattgaata ttctttttac ttgggaaatc acgaaaccaa ctatacgcta
1080
catctagttg cgattactgg caatgtcccc aatgcaatcc cggaaaacaa agattttggtg
1140
ttttctactt gggatcacaa agcaaaagga cacttcaact gtccagaggg ttattcagga
1200
ggctggtggt ggcatgatga gtgtggagaa aacaacctaa atggtaaata taacaacca
1260
agagcaaaat ctaagccaga gaggagaaga ggattatctt ggaagtctca aaatggaagg
1320
ttatactcta taaaatcaac caaaatggtg atccatccaa cagattcaga aagctttgaa
1380
tga
1383
    
```

10 <210> 163
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 163

```

Met His Thr Ile Lys Leu Phe Leu Phe Val Val Pro Leu Val Ile Ala
 1           5           10           15
Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Pro Ser Glu
           20           25           30
Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
           35           40           45
Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
           50           55           60
Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
           65           70           75           80
Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys Glu Glu Glu
    
```

ES 2 699 499 T3

				85					90					95					
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu				
			100					105					110						
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Val	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu				
		115						120					125						
Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	His	Lys	Val	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Gln				
		130						135					140						
Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Leu	Ser	Pro	Ala	Gly	Ala	Gln	Glu	His	Pro	Glu				
145					150						155				160				
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Arg				
				165							170				175				
Glu	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Gln				
				180							185				190				
His	Met	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Lys	Gln	Leu	Arg	Lys	Thr	Gly	Ile				
		195						200					205						
Gln	Glu	Pro	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	Ser	Arg	Ala	Pro	Arg				
		210					215						220						
Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	Gln	Leu	Asn	Glu	Thr	Glu	Asn	Thr	Glu	Gln	Asp				
225					230						235				240				
Asp	Leu	Pro	Ala	Asp	Cys	Ser	Ala	Val	Tyr	Asn	Arg	Gly	Glu	His	Thr				
				245						250					255				
Ser	Gly	Val	Tyr	Thr	Ile	Lys	Pro	Arg	Asn	Ser	Gln	Gly	Phe	Asn	Val				
			260						265					270					
Tyr	Cys	Asp	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Pro	Trp	Thr	Leu	Ile	Gln	His	Arg				
		275						280					285						
Lys	Asp	Gly	Ser	Gln	Asp	Phe	Asn	Glu	Thr	Trp	Glu	Asn	Tyr	Glu	Lys				
		290				295						300							
Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ile				
305					310						315				320				
Tyr	Ala	Ile	Val	Gln	Gln	Ser	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln				
				325						330					335				
Asp	Trp	Lys	Asp	Ser	Lys	His	Tyr	Val	Glu	Tyr	Ser	Phe	His	Leu	Gly				
			340						345					350					
Ser	His	Glu	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ala	Glu	Ile	Ala	Gly	Asn				
		355						360						365					
Ile	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Glu	His	Thr	Asp	Leu	Met	Phe	Ser	Thr	Trp				
		370					375						380						
Asn	His	Arg	Ala	Lys	Gly	Gln	Leu	Tyr	Cys	Pro	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly				
385					390						395				400				
Gly	Trp	Trp	Trp	Asn	Asp	Ile	Cys	Gly	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Gly	Lys				
				405						410					415				
Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Thr	Lys	Ser	Arg	Pro	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ile				
			420						425					430					
Tyr	Trp	Arg	Pro	Gln	Ser	Arg	Lys	Leu	Tyr	Ala	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys				
		435						440						445					
Met	Met	Leu	Gln	Pro	Thr	Thr													
	450							455											

<210> 164
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 164
 Met Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Met Leu Cys Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Ala Val Leu Leu Ser Ala Gln Gly Gly Pro Val Gln Ser Lys Ser

ES 2 699 499 T3

			20					25					30			
Pro	Arg	Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Glu	Met	Asn	Val	Leu	Ala	His	Gly	Leu	
		35					40					45				
Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Glu	His	Ala	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	
	50					55					60					
Gln	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Leu	Ser	Ala	Cys	Gly	Ser	Ala	Cys	
65					70					75					80	
Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Leu	Ala	Pro	Glu	Ser	Arg	
				85					90					95		
Val	Asp	Pro	Glu	Val	Leu	His	Ser	Leu	Gln	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Gln	
			100					105					110			
Asn	Ser	Arg	Ile	Gln	Gln	Leu	Phe	His	Lys	Val	Ala	Gln	Gln	Gln	Arg	
		115					120					125				
His	Leu	Glu	Lys	Gln	His	Leu	Arg	Ile	Gln	His	Leu	Gln	Ser	Gln	Phe	
	130					135					140					
Gly	Leu	Leu	Asp	His	Lys	His	Leu	Asp	His	Glu	Val	Ala	Lys	Pro	Ala	
145					150					155					160	
Arg	Arg	Lys	Arg	Leu	Pro	Glu	Met	Ala	Gln	Pro	Val	Asp	Pro	Ala	His	
				165					170					175		
Asn	Val	Ser	Arg	Leu	His	Arg	Leu	Pro	Arg	Asp	Cys	Gln	Glu	Leu	Phe	
			180					185					190			
Gln	Val	Gly	Glu	Arg	Gln	Ser	Gly	Leu	Phe	Glu	Ile	Gln	Pro	Gln	Gly	
		195					200					205				
Ser	Pro	Pro	Phe	Leu	Val	Asn	Cys	Lys	Met	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Trp	
	210					215					220					
Thr	Val	Ile	Gln	Arg	Arg	His	Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Asn	Arg	Pro	
225					230						235				240	
Trp	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ala	Gly	Phe	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Glu	Phe	Trp	
				245					250					255		
Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Val	His	Ser	Ile	Thr	Gly	Asp	Arg	Asn	Ser	Arg	
			260					265					270			
Leu	Ala	Val	Gln	Leu	Arg	Asp	Trp	Asp	Gly	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Gln	
		275					280					285				
Phe	Ser	Val	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Thr	Ala	Tyr	Ser	Leu	Gln	Leu	
	290					295					300					
Thr	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Gln	Leu	Gly	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Pro	Ser	
305					310						315				320	
Gly	Leu	Ser	Val	Pro	Phe	Ser	Thr	Trp	Asp	Gln	Asp	His	Asp	Leu	Arg	
				325					330					335		
Arg	Asp	Lys	Asn	Cys	Ala	Lys	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Gly	
			340					345					350			
Thr	Cys	Ser	His	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Gln	Tyr	Phe	Arg	Ser	Ile	Pro	
		355					360					365				
Gln	Gln	Arg	Gln	Lys	Leu	Lys	Lys	Gly	Ile	Phe	Trp	Lys	Thr	Trp	Arg	
	370					375					380					
Gly	Arg	Tyr	Tyr	Pro	Leu	Gln	Ala	Thr	Thr	Met	Leu	Ile	Gln	Pro	Met	
385					390					395					400	
Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Ser											
				405												

<210> 165
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

ES 2 699 499 T3

<400> 165

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Leu Ser Pro Glu
 1 5 10 15
 Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
 20 25 30
 Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
 35 40 45
 Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
 65 70 75 80
 Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
 85 90 95
 Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 100 105 110
 Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 115 120 125
 Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Glu Thr Pro Glu His Pro Glu
 130 135 140
 Val Thr Ser Leu Lys Thr Phe Val Glu Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile
 145 150 155 160
 Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly
 165 170 175
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 180 185 190
 Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 195 200 205
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 210 215 220
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
 225 230 235 240
 Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 245 250 255
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 260 265 270
 Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 275 280 285
 Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
 290 295 300
 Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
 305 310 315 320
 Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
 325 330 335
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
 340 345 350
 Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
 355 360 365
 Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
 370 375 380
 Gly Lys
 385

5 <210> 166
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 699 499 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 166

5

```

Gly Ala Pro Ser Arg Val Asp Pro Asp Leu Ser Ser Phe Asp Ser Ala
 1          5          10          15
Pro Ser Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile
      20          25          30
Leu Ala Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val
      35          40          45
His Lys Thr Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile
      50          55          60
Phe Asp Gln Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Arg Thr Asn Glu Ile Lys
65          70          75          80
Glu Glu Glu Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Ser Thr Leu Gln Val Lys
      85          90          95
Asn Glu Glu Val Lys Asn Met Ser Val Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu
      100          105          110
Ser Leu Leu Glu Glu Lys Thr Ala Leu Gln His Lys Val Arg Ala Leu
      115          120          125
Glu Glu Gln Leu Thr Asn Leu Ile Leu Ser Pro Ala Gly Ala Gln Glu
      130          135          140
His Pro Glu Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Gln Gln Asp Asn
145          150          155          160
Ser Ile Arg Glu Leu Leu Gln Ser Val Glu Glu Gln Tyr Lys Gln Leu
      165          170          175
Ser Gln Gln His Met Gln Ile Lys Glu Ile Glu Lys Gln Leu Arg Lys
      180          185          190
Thr Gly Ile Gln Glu Pro Ser Glu Asn Ser Leu Ser Ser Lys Ser Arg
      195          200          205
Ala Pro Arg Thr Thr Pro Pro Leu Gln Leu Asn Glu Thr Glu Asn Thr
      210          215          220
Glu Gln Asp Ala Ser His His His His His His
225          230          235

```

<210> 167
<211> 182
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

<400> 167

15

```

Ser Arg Ile Asp Gln Asp Asn Ser Ser Phe Asp Ser Val Ser Pro Glu
 1          5          10          15
Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn
      20          25          30
Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr
      35          40          45
Lys Gly Gln Ile Asn Asp Ile Phe Gln Lys Leu Asn Ile Phe Asp Gln
      50          55          60
Ser Phe Tyr Asp Leu Ser Leu Gln Thr Ser Glu Ile Lys Glu Glu Glu
65          70          75          80
Lys Glu Leu Arg Arg Thr Thr Tyr Lys Leu Gln Val Lys Asn Glu Glu
      85          90          95

```

ES 2 699 499 T3

Val Lys Asn Met Ser Leu Glu Leu Asn Ser Lys Leu Glu Ser Leu Leu
 100 105 110
 Glu Glu Lys Ile Leu Leu Gln Gln Lys Val Lys Tyr Leu Glu Glu Gln
 115 120 125
 Leu Thr Asn Leu Ile Gln Asn Gln Pro Ala Thr Pro Glu His Pro Glu
 130 135 140
 Val Thr Ser Leu Lys Ser Phe Val Glu Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 145 150 155 160
 Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 165 170 175
 His His His His His
 180

5 <210> 168
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 168

Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala His Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu His Ala Glu Arg Thr Arg Ser Gln
 20 25 30
 Leu

15 <210> 169
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 169

Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala Asn Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Gln Leu Gly His Gly Leu Lys Asp Phe Val His Lys Thr Lys Gly Gln
 20 25 30
 Ile

25
 30 <210> 170
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético
 35 <400> 170

ES 2 699 499 T3

Glu Pro Lys Ser Arg Phe Ala Met Leu Asp Asp Val Lys Ile Leu Ala

1 5 10 15
Asn Gly Leu Leu Gln Leu Gly His Gly Leu
20 25

5 <210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético
<400> 171

Ala Gly Ser Ser Pro Gly Gly
1 5

15 <210> 172
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético
<400> 172

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

25
30 <210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintético
<400> 173

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Lys
1 5 10

40 <210> 174
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético
<400> 174

ES 2 699 499 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Lys
1 5

5
<210> 175
<211> 455
<212> PRT
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 175

ES 2 699 499 T3

Met	His	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Leu	Phe	Val	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Ser
1				5					10					15	
Ser	Arg	Val	Asp	Pro	Asp	Leu	Ser	Pro	Phe	Asp	Ser	Val	Pro	Ser	Glu
			20					25					30		
Pro	Lys	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn
		35					40					45			
Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr
	50					55					60				
Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln
65					70					75					80
Cys	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Asn	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu
				85					90						95
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu
			100					105					110		
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu
		115					120					125			
Glu	Glu	Lys	Met	Ala	Leu	Gln	His	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Glu	Glu	Gln
	130					135					140				
Leu	Thr	Ser	Leu	Val	Gln	Asn	Pro	Pro	Gly	Ala	Arg	Glu	His	Pro	Glu
145					150					155					160
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Gln	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Arg
				165					170						175
Glu	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln	Gln
			180					185						190	
His	Ile	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Leu	Arg	Lys	Thr	Gly	Ile
		195					200					205			
Gln	Glu	Pro	Thr	Glu	Asn	Ser	Leu	Tyr	Ser	Lys	Pro	Arg	Ala	Pro	Arg
	210					215					220				
Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	His	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Asn	Ile	Glu	Gln	Asp
225					230					235					240
Asp	Leu	Pro	Ala	Asp	Cys	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Arg	Gly	Glu	His	Thr
				245					250					255	
Ser	Gly	Val	Tyr	Thr	Ile	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Gln	Val	Phe	Asn	Val
			260					265					270		
Tyr	Cys	Asp	Thr	Gln	Ser	Gly	Thr	Pro	Arg	Thr	Leu	Ile	Gln	His	Arg
		275					280					285			
Lys	Asp	Gly	Ser	Gln	Asn	Phe	Asn	Gln	Thr	Trp	Glu	Asn	Tyr	Glu	Lys
	290					295					300				
Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ile
305					310					315					320
Tyr	Ala	Ile	Val	Lys	Gln	Ser	Asn	Tyr	Ile	Leu	Arg	Leu	Glu	Leu	Gln
				325					330						335
Asp	Trp	Lys	Asp	Ser	Lys	His	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Ser	Phe	His	Leu	Gly
			340					345					350		
Asn	His	Glu	Thr	Asn	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Asn
		355					360					365			
Ile	Pro	Glu	Ala	Leu	Pro	Glu	His	Arg	Asp	Leu	Met	Phe	Ser	Thr	Trp
	370					375					380				
Asp	His	Arg	Ala	Lys	Gly	Gln	Leu	Tyr	Cys	Pro	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly
385					390					395					400
Gly	Trp	Trp	Phe	Ser	Asp	Met	Cys	Gly	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Gly	Lys
				405					410					415	
Tyr	Asn	Lys	Pro	Arg	Ala	Lys	Ser	Lys	Pro	Glu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ile

ES 2 699 499 T3

Met	Phe	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Ser
1				5					10					15	
Ser	Arg	Ile	Asp	Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	Phe	Asp	Ser	Val	Ser	Pro	Glu
			20					25					30		
Pro	Lys	Ser	Arg	Phe	Ala	Met	Leu	Asp	Asp	Val	Lys	Ile	Leu	Ala	Asn
		35					40					45			
Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Lys	Asp	Phe	Val	His	Lys	Thr
	50					55					60				
Lys	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Ile	Phe	Gln	Lys	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Gln
65					70					75					80
Ser	Phe	Tyr	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Glu
				85					90					95	
Lys	Glu	Leu	Arg	Arg	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Gln	Val	Lys	Asn	Glu	Glu
			100					105					110		
Val	Lys	Asn	Met	Ser	Leu	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu
		115					120					125			
Glu	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Gln	Gln	Lys	Val	Lys	Tyr	Leu	Glu	Glu	Gln
	130					135					140				
Leu	Thr	Asn	Leu	Ile	Gln	Asn	Gln	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	His	Pro	Glu
145					150					155					160
Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Ser	Phe	Val	Glu	Lys	Gln	Asp	Asn	Ser	Ile	Lys
				165					170					175	
Asp	Leu	Leu	Gln	Thr	Val	Glu	Glu	Gln	Tyr	Lys	Gln	Leu	Asn	Gln	Gln
			180					185					190		
His	Ser	Gln	Ile	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Gln	Leu	Arg	Met	Thr	Asn	Ile
		195					200					205			
Gln	Glu														
	210														

<210> 178

<211> 356

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 178

ES 2 699 499 T3

Gly	Pro	Val	Gln	Ser	Lys	Ser	Pro	Arg	Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Glu	Met
1				5					10					15	
Asn	Val	Leu	Ala	His	Gly	Leu	Leu	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Leu	Arg	Glu
			20					25					30		
His	Ala	Glu	Arg	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg	Arg	Leu
		35					40					45			
Ser	Ala	Cys	Gly	Ser	Ala	Cys	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Asp	Leu
	50					55					60				
Pro	Leu	Ala	Pro	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Pro	Glu	Val	Leu	His	Ser	Leu
65					70					75					80
Gln	Thr	Gln	Leu	Lys	Ala	Gln	Asn	Ser	Arg	Ile	Gln	Gln	Leu	Phe	His
				85					90					95	
Lys	Val	Ala	Gln	Gln	Gln	Arg	His	Leu	Glu	Lys	Gln	His	Leu	Arg	Ile
			100					105					110		
Gln	His	Leu	Gln	Ser	Gln	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro
		115					120					125			
Thr	Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu
	130						135				140				
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu
145					150					155					160
Met	Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
					165				170					175	
Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu
			180					185					190		
Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr
		195					200					205			
Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser
	210					215					220				
Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro
225					230					235					240
Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln
				245					250					255	
Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val
			260				265						270		
Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val
		275					280					285			
Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu
	290					295					300				
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg
305					310					315					320
Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val
				325					330					335	
Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg
			340					345					350		
Thr	Pro	Gly	Lys												
		355													

<210> 179
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 179

ES 2 699 499 T3

```

gaggtgcagc ttttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttagc acctatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggaggg ggtctcaggt attagtggta ctggttatag aacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa ctcgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgg 300
ggcttactat ggttcgggga attaacctac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

```

5 <210> 180
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 180

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
  20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Gly Val

          35          40          45
Ser Gly Ile Ser Gly Thr Gly Tyr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
  50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
  65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Lys Asp Arg Gly Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Thr Tyr Trp Gly
          100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

15 <210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 181
 ggattcacct ttagcaccta tgcc 24

25 <210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

<400> 182

35

ES 2 699 499 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala
 1 5

5 <210> 183
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 183
 attagtggta ctggtatag aaca 24

15 <210> 184
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 184

Ile Ser Gly Thr Gly Tyr Arg Thr

1 5

25 <210> 185
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintético

35 <400> 185
 gcgaaagatc ggggcttact atggctcggg gaattaacct ac 42

40 <210> 186
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 186

Ala Lys Asp Arg Gly Leu Leu Trp Phe Gly Glu Leu Thr Tyr
 1 5 10

50 <210> 187
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintético

ES 2 699 499 T3

<400> 187

```

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gagtattaat aactgggttg cctgggatca acagaaacca 120
gggaaggccc ctaacctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacaa tataatgatt attggacggt cggccaaggg 300
accaaggtgg aatcaaaa                                     318
    
```

5 <210> 188
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 188

```

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

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

15 <210> 189
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

25 <400> 189
 cagagtatta ataactgg 18

30 <210> 190
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 190

```

Gln Ser Ile Asn Asn Trp
 1           5
    
```

ES 2 699 499 T3

5 <210> 191
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

10 <400> 191
aaggcgtct 9

15 <210> 192
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

20 <400> 192

Lys Ala Ser
1

25 <210> 193
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 193
caacaatata atgattattg gacg 24

35 <210> 194
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 194

Gln Gln Tyr Asn Asp Tyr Trp Thr
1 5

45

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína 3 similar a angiopoyetina humana (hANGPTL3) de la SEQ ID NO:161 y neutraliza, reduce o interfiere en, al menos una actividad de hANGPTL3, en el que el anticuerpo o fragmento:
- (a) comprende un par de secuencias de HCVR y LCVR (HCVR/LCVR) de la SEQ ID NO: 66/74;
- (b) comprende secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y secuencias de CDR de cadena ligera, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, contenidas dentro de un par de secuencias de región variable de cadena pesada (HCVR) y de región variable de cadena ligera (LCVR) (HCVR/LCVR) de la SEQ ID NO: 66/74, en el que las CDR están determinadas por la definición de Kabat, la definición de Chothia o la definición de AbM; o
- (c) comprende una combinación de secuencias HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3 de las SEQ ID NO: 68/70/72/76/78/80.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:
- (a) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reacciona de forma cruzada con ANGPTL3 de macaco cangrejero; y/o
- (b) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reacciona de forma cruzada con ANGPTL3 de ratón o de rata; y/o
- (c) el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno reacciona de forma cruzada con cualquiera de ANGPTL3 de macaco cangrejero, ANGPTL3 de ratón y ANGPTL3 de rata.
3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 o 2, en el que:
- (a) el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo monocatenario, un Fab o un F(ab')₂; y/o
- (b) el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo quimérico o completamente humano.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es una IgG1 o IgG4.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6.
8. Un método de producción de un anticuerpo anti-hANGPTL3 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 7 en condiciones que permiten la producción del anticuerpo o fragmento del mismo, y recuperar el anticuerpo o fragmento del mismo producido de este modo.
9. Una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de los mismos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o uno o más anticuerpos de la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de HMG-CoA reductasa, niacina, un fibrato, 22-hidroxicolesterol, ezetimiba más simvastatina, una estatina con una resina biliar, niacina más una estatina, niacina más un éster etílico de ácidos grasos omega-3, una estatina, un anticuerpo anti-hANGPTL4 y un anticuerpo anti-PCSK9.
11. Un anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o un anticuerpo de la reivindicación 4, o una composición farmacéutica de la reivindicación 9 o 10, para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno que se previene, mitiga, mejora o inhibe por la reducción o inhibición de la actividad de ANGPTL3, en el que dicha enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, quilomicronemia, dislipidemia aterogénica, dislipidemia mixta, una enfermedad o trastorno cardiovascular, pancreatitis aguda, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), diabetes y obesidad.
12. El anticuerpo, fragmento o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la hipercolesterolemia es hipercolesterolemia familiar homocigótica con LDLR δ .
13. El anticuerpo, fragmento o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el método comprende adicionalmente administrar al sujeto uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de HMG-CoA reductasa, niacina, un fibrato, 22-hidroxicolesterol, ezetimiba más simvastatina, una estatina con una resina biliar, niacina más una estatina, niacina más un éster etílico de ácidos grasos

omega-3, una estatina, un anticuerpo anti-hANGPTL4 y un anticuerpo anti-PCSK9.

14. El anticuerpo, fragmento o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo y el uno o más agentes terapéuticos adicionales se administran de forma concurrente o secuencial.

5

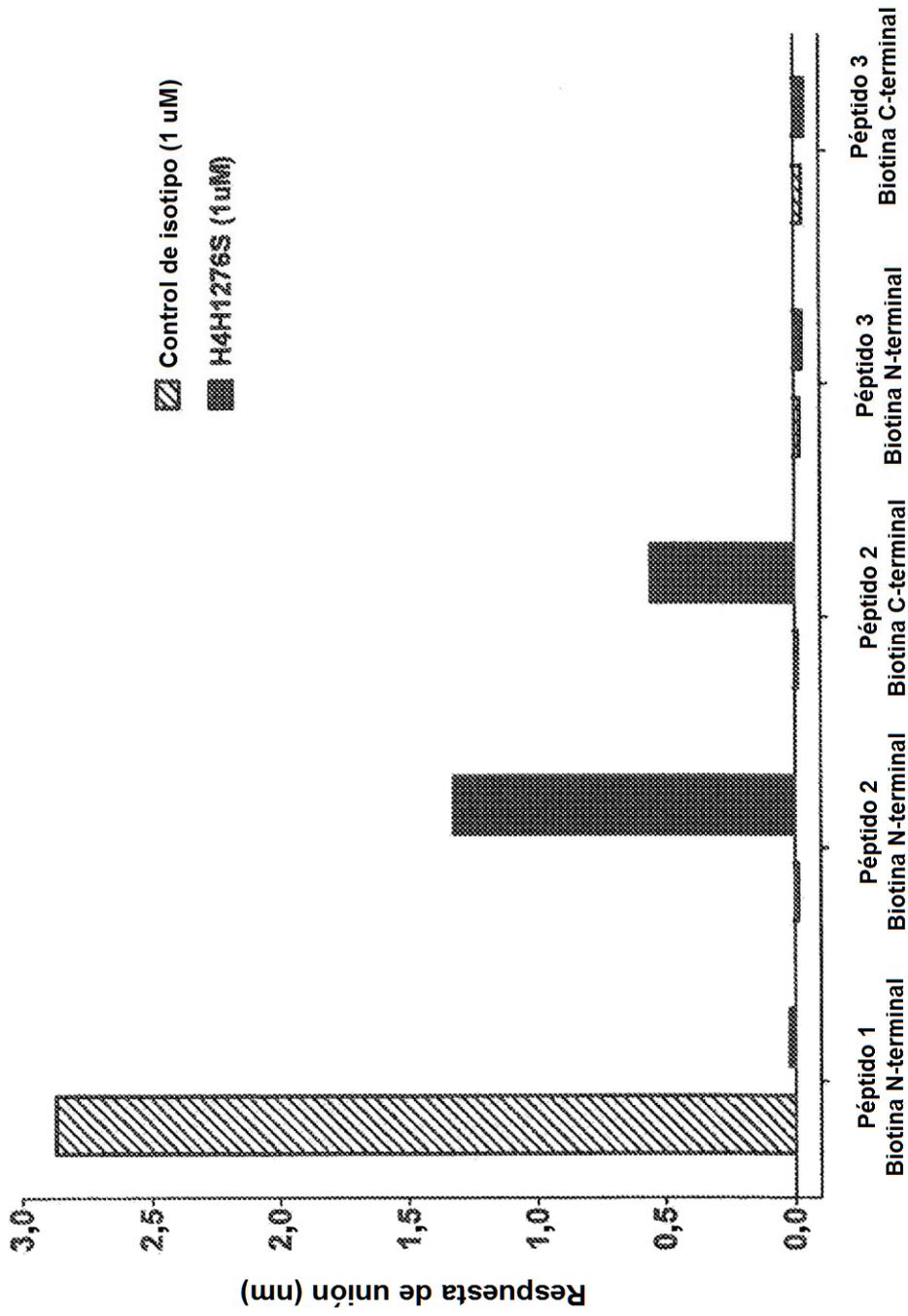


Fig. 2