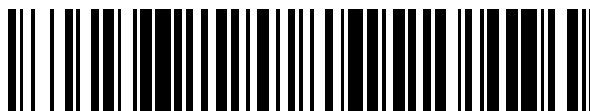


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 040**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (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: **10.12.2010 PCT/US2010/059959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2011 WO11072263**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10795172 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019 EP 2510013**

54 Título: **Antagonistas de PCSK9**

30 Prioridad:

11.12.2009 US 285942 P

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

01.10.2019

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**RUE, SARAH;
COHEN, STEVEN, B.;
LI, JUN y
YOWE, DAVID**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 726 040 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

Antagonistas de PCSK9

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES DE PATENTE RELACIONADAS

La presente invención reivindica el beneficio de prioridad respecto a la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N.º 61/285 942, presentada el 11 de diciembre de 2009.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a antagonistas que son anticuerpos contra PCSK9.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) previene la aterosclerosis e hipercolesterolemia mediante la eliminación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el torrente sanguíneo. El LDL-R se regula a nivel postraduccional por acción de la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9a ("PCSK9"). Recientemente, se ha descrito la supresión de PCSK9 en ratones. Estos ratones mostraron una reducción de aproximadamente un 50% en los niveles de colesterol en plasma y mostraron una mayor sensibilidad frente a las estatinas a la hora de reducir el colesterol en plasma (Rashid S *et al* (2005) *Proc Natl Acad Sci* 102:5374-5379. Los datos genéticos humanos también están a favor del papel de PCSK9 en la homeostasis de LDL. Recientemente, se han identificado dos mutaciones que presuntamente son mutaciones de "pérdida de función" en PCSK9. Los individuos con estas mutaciones presentan una reducción de aproximadamente un 40% de los niveles en plasma de LDL-C, lo cual se traduce en una reducción de aproximadamente un 50-90% de enfermedad coronaria. Considerados de forma conjunta, estos estudios indican que un inhibidor de PCSK9 sería beneficioso para reducir las concentraciones en plasma de LDL-C y otras afecciones patológicas mediadas por PCSK9 y este se podría coadministrar, p. ej., con un segundo agente útil para reducir el colesterol con el fin de obtener una mayor eficacia.

30 El documento WO2008057459 describe un anticuerpo anti-PCSK9 que antagoniza la inhibición por parte de PCSK9 de la captación de LDL celular.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

35 La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona anticuerpos según se definen en las reivindicaciones que se unen a la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9) (p. ej., SEQ ID NO:47) y antagonizan su función, y a métodos para utilizar tales anticuerpos, p. ej., para tratar afecciones patológicas mediadas por PCSK9. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9), donde el anticuerpo comprende:

una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden cada una las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; donde:

- 45 i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6;
- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9;
- iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20;
- 50 v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; y
- vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, o donde:
- i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7;
- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10;
- 55 iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21;
- v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; y
- 60 vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

La divulgación proporciona anticuerpos y moléculas de unión al antígeno que se unen a la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9). En algunas realizaciones, el anticuerpo:

- a) no bloquea la unión de PCSK9 al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) y
- b) inhibe la degradación de LDLR mediada por PCSK9.

ES 2 726 040 T3

En algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno se une a al menos un aminoácido en las posiciones de residuos 680-692 de PCSK9 humana. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno se une a un epítipo de PCSK9 dentro de la secuencia de aminoácidos RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:49).

5 En algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno se une a PCSK9 humana con una constante de disociación de equilibrio (KD) de aproximadamente 500 pM o inferior. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno se une a PCSK9 humana con una constante de disociación de equilibrio (KD) de aproximadamente 400 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 190 pM, 180 pM, 170 pM, 160 pM, 150 pM, 140 pM o inferior.

10 En algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno tiene una semivida *in vivo* de al menos aproximadamente 7 días. En algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno tiene una semivida *in vivo* de al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días. En algunos casos, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno ejerce un efecto reductor del colesterol *in vivo* de al menos aproximadamente 2 semanas, por ejemplo, 2, 3, 4 semanas o más. Preferentemente, la semivida *in vivo* se determina en un sujeto humano.

15 En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo comprende
(a) una región variable de la cadena pesada que comprende un segmento V de la cadena pesada humana, una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada y una región de marco 4 (FR4) de la cadena pesada, y

20 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un segmento V de la cadena ligera humana, una CDR3 de la cadena ligera y una FR4 de la cadena ligera, donde

i) la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14); y

ii) la región variable CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

25 En algunos casos, el anticuerpo comprende
(a) una región variable de la cadena pesada que comprende un segmento V de la cadena pesada humana, una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada y una región de marco 4 (FR4) de la cadena pesada, y

30 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un segmento V de la cadena ligera humana, una CDR3 de la cadena ligera y una FR4 de la cadena ligera, donde

i) la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SYYYNMDY (SEQ ID NO:12); y

ii) la región variable CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

35 En algunos casos, el anticuerpo comprende
(a) una región variable de la cadena pesada que comprende un segmento V de la cadena pesada humana, una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada y una región de marco 4 (FR4) de la cadena pesada, y

40 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende un segmento V de la cadena ligera humana, una CDR3 de la cadena ligera y una FR4 de la cadena ligera, donde

i) la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SYYYAMDY (SEQ ID NO:13); y

ii) la región variable CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

45 En algunos casos, la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13; y la CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

50 En algunos casos, el segmento V de la cadena pesada presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial respecto a SEQ ID NO:28, y donde el segmento V de la cadena ligera presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial respecto a SEQ ID NO:31.

55 En algunos casos, el segmento V de la cadena pesada presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial respecto a SEQ ID NO:27, y donde el segmento V de la cadena ligera presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial respecto al aminoácido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30.

60 En algunos casos, la FR4 de la cadena pesada es una FR4 de la línea germinal humana. En algunas realizaciones, la FR4 de la cadena pesada es la SEQ ID NO:35.

65 En algunos casos, la FR4 de la cadena ligera es una FR4 de la línea germinal humana. En algunas realizaciones, la FR4 de la cadena ligera es la SEQ ID NO:39.

En algunos aspectos de la divulgación, el segmento V de la cadena pesada y el segmento V de la cadena ligera comprenden cada uno de ellos una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) y una región determinante de la complementariedad 2 (CDR2); donde:

- i) la CDR1 del segmento V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8;
- ii) la CDR2 del segmento V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11;
- iii) la CDR1 del segmento V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22; y
- iv) la CDR2 del segmento V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25.

5 En algunos casos, el segmento V de la cadena pesada y el segmento V de la cadena ligera comprenden cada uno de ellos una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) y una región determinante de la complementariedad 2 (CDR2); donde:

- i) la CDR1 del segmento V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7;
- ii) la CDR2 del segmento V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10;
- iii) la CDR1 del segmento V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; y
- iv) la CDR2 del segmento V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24.

En algunas realizaciones,

- 15 i) la CDR1 del segmento V de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:7;
- ii) la CDR2 del segmento V de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO:10;
- iii) la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13;
- iv) la CDR1 del segmento V de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:21;
- 20 v) la CDR2 del segmento V de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:24; y
- vi) la CDR3 de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO:26.

25 En algunos casos, la región variable de la cadena pesada presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a la región variable de SEQ ID NO:40 y la región variable de la cadena ligera presenta al menos un 90% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a la región variable de SEQ ID NO:41.

30 En algunos casos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:40 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:41.

35 En algunos casos, la región variable de la cadena pesada presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a la región variable seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4 y la región variable de la cadena ligera presenta al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a la región variable seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:18.

40 En algunas realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:18.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo es una IgG. En algunas realizaciones, el anticuerpo es una IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una cadena pesada que comparte al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial respecto a un aminoácido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una cadena ligera que comparte al menos un 85%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial respecto a un aminoácido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:19.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento FAb'. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única (scFv). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 humana está mutada para que tenga una menor afinidad de unión por un ligando efector tal como un receptor Fc (FcR), p. ej., Fc gamma R1, en una célula o el componente C1 del complemento. Remítase, p. ej., a la Patente de EE. UU. N.º 5 624 821. En algunas realizaciones, los residuos aminoácidos L234 y L235 de la región constante de IgG1 se sustituyen por Ala234 y Ala235. La numeración de los residuos en la región constante de la cadena pesada es la del índice EU (remítase a Kabat *et al.*, (1983) "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Departamento de Servicios Humanos y Sanitarios de los EE. UU.).

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo está unido a una proteína portadora, por ejemplo, albúmina.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo está PEGilado.

65 La divulgación proporciona anticuerpos que se unen a PCSK9, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden cada una de ellas las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; donde:

- i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8;

- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11;
- iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22;
- v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25;
- vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

En algunos casos,

- i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7;
- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10;
- iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21;
- v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24;
- vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se unen a PCSK9, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden cada una de ellas las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; donde:

- i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6;
- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9;
- iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20;
- v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23;
- vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se unen a PCSK9, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden cada una de ellas las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; donde:

- i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7;
- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10;
- iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21;
- v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24;
- vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se unen a PCSK9, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden cada una de ellas las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; donde:

- i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7;
- ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10;
- iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13;
- iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21;
- v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24;
- vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo o molécula de unión al antígeno según se menciona en las reivindicaciones y un excipiente fisiológicamente compatible.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un segundo agente que reduce los niveles de colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL-C) en un individuo.

En algunas realizaciones, el segundo agente es una estatina. Por ejemplo, la estatina se puede seleccionar del grupo constituido por atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

5 En algunas realizaciones, el segundo agente se selecciona del grupo constituido por fibratos, niacina y sus análogos, un inhibidor de la absorción de colesterol, un captador de ácido biliar, un mimético de la hormona de la tiroides, un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP), un inhibidor de la diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), un ácido nucleico inhibidor que tenga PCSK9 como diana y un ácido nucleico inhibidor que tenga apoB100 como diana.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o molécula de unión al antígeno según se menciona en las reivindicaciones, para su uso en un método de reducción de LDL-C en un individuo que lo necesite.

15 En algunas realizaciones, el individuo presenta un grado de respuesta anormalmente bajo a la terapia de estatinas o es resistente a esta. En algunas realizaciones, el individuo es intolerante a la terapia de estatinas. En algunas realizaciones, el individuo tiene un nivel de LDL-C de referencia de al menos aproximadamente 100 mg/dL, por ejemplo, al menos aproximadamente 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 mg/dL o superior. En algunas realizaciones, el individuo padece hipercolesterolemia familiar. En algunas realizaciones, el individuo padece trigliceridemia. En algunas realizaciones, el individuo tiene una mutación del gen PCSK9 de ganancia de función. En algunas realizaciones, el individuo padece dislipidemia inducida por fármacos.

En algunas realizaciones, el colesterol total se reduce con LDL-C.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo para dicho uso es para la administración con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente eficaz a la hora de reducir LDL-C en el individuo.

30 En algunas realizaciones, el segundo agente es una estatina. Por ejemplo, la estatina se puede seleccionar del grupo constituido por atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

35 En algunas realizaciones, el segundo agente se selecciona del grupo constituido por fibratos, niacina y sus análogos, inhibidores de la absorción de colesterol, captadores de ácido biliar, miméticos de la hormona de la tiroides, un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP), un inhibidor de la diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), un ácido nucleico inhibidor que tenga PCSK9 como diana y un ácido nucleico inhibidor que tenga apoB100 como diana.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo o molécula de unión al antígeno para dicho uso y el segundo agente son para la coadministración como una mezcla o para la coadministración por separado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo para dicho uso es para la administración intravenosa o para la administración subcutánea.

DEFINICIONES

45 Un «anticuerpo» se refiere a un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas o un polipéptido que comprende fragmentos de una inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno correspondiente de manera no covalente, reversible y específica. Una unidad estructural ilustrativa de un anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena «ligera» (de aproximadamente 25 kD) y una «pesada» (de aproximadamente 50-70 kD), conectadas mediante un enlace de tipo disulfuro. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante κ , λ , α , γ , δ , ϵ y μ , así como también los innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como κ o λ . Las cadenas pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ o ϵ , las cuales definen a su vez las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Las expresiones «cadena ligera variable» (V_L) y «cadena pesada variable» (V_H) se refieren a estas regiones de las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Un «anticuerpo», tal como se utiliza en esta solicitud, engloba todas las variaciones del anticuerpo y fragmentos de este que poseen una unión particular específicamente, p. ej., para PCSK9. Por lo tanto, dentro del alcance de este concepto, se encuentran anticuerpos de longitud completa, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única (ScFv), Fab, Fab' y versiones multiméricas de estos fragmentos (p. ej., $F(ab')_2$) con la misma especificidad de unión.

65 Los «dominios determinantes de la complementariedad» o «regiones determinantes de la complementariedad» («CDR») se refieren indistintamente a las regiones hipervariables de V_L y V_H . Las CDR son los sitios de unión a la proteína diana de las cadenas del anticuerpo que albergan la especificidad por tal proteína diana. Existen tres CDR (CDR1-3, numeradas de forma secuencial a partir del extremo N-terminal) en cada V_L o V_H humana, que constituyen

aproximadamente un 15-20% de los dominios variables. Las CDR son complementarias desde el punto de vista estructural respecto al epítipo de la proteína diana y, por lo tanto, son las responsables directas de la especificidad de unión. Los tramos restantes de V_L o V_H , que se denominan regiones de marco, exhiben menos variación en la secuencia de aminoácidos (Kuby, *Immunology*, 4.^a ed., Capítulo 4. W.H. Freeman & Co., Nueva York, 2000).

Las posiciones de las CDR y las regiones de marco se determinan utilizando varias definiciones muy conocidas en la técnica, p. ej., Kabat, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) (en la página de Internet imgt.cines.fr/) y AbM (remítase, p. ej., a Johnson *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997)). Las definiciones de sitios de combinación de antígenos también se describen en los siguientes documentos: Ruiz *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); y Lefranc, M.P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); y Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); y Rees *et al.*, en Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

La expresión «determinante de la especificidad de unión» o el término «BSD» (por sus siglas en inglés) se refieren indistintamente a la secuencia mínima de aminoácidos contiguos o no contiguos con una región determinante de la complementariedad necesaria para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo. Un determinante mínimo de la especificidad de unión se puede encontrar en una o más secuencias de CDR. En algunas realizaciones, los determinantes mínimos de la especificidad de unión residen en (es decir, están determinados únicamente por) una porción o la longitud completa de las secuencias de CDR3 de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo.

Una «cadena ligera del anticuerpo» o una «cadena pesada del anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende la V_L o V_H , respectivamente. La V_L endógena está codificada por los segmentos V (variable) y J (de juntura) del gen, y la V_H endógena por V, D (diversidad) y J. Cada una de V_L o V_H incluye las CDR así como también las regiones de marco. En esta solicitud, las cadenas ligeras del anticuerpo y/o las cadenas pesadas del anticuerpo pueden, de vez en cuando, denominarse de forma colectiva «cadenas del anticuerpo». Estas expresiones engloban cadenas del anticuerpo que contienen mutaciones que no alteran la estructura básica de V_L o V_H , con lo cual estará familiarizado un experto en la técnica.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos mediante la digestión con varias peptidasas. De este modo, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de las uniones de tipo disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab' que es de por sí una cadena ligera unida a V_H - C_H1 mediante un enlace de tipo disulfuro. El $F(ab)'_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper la unión de tipo disulfuro en la región de bisagra, con lo que el dímero $F(ab)'_2$ se convierte en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra. Paul, *Fundamental Immunology* 3.^a ed. (1993). Aunque varios fragmentos de anticuerpos se definen según la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar *de novo* ya sea químicamente o utilizando una metodología de ADN recombinante. De este modo, el término «anticuerpo», tal como se utiliza en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpos ya sean producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros, o aquellos sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (p. ej., Fv de cadena única) o aquellos identificados utilizando colecciones de presentación de fagos (remítase, p. ej., a McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, se puede utilizar cualquier técnica conocida en la materia (remítase, p. ej., a Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, págs. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente de EE. UU. N.º 4 946 778) con el fin de producir anticuerpos para polipéptidos de esta invención. Además, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Como alternativa, se puede utilizar la tecnología de presentación de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unan específicamente a antígenos seleccionados (remítase, p. ej., a McCafferty *et al.*, *supra*; Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10:779-783, (1992)).

Los métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos que le han sido introducidos a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos se suelen denominar residuos importados, los cuales proceden habitualmente de un dominio variable importado. La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (remítase, p. ej., a Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de EE. UU. N.º 4 816 567), donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región determinante de la complementariedad («CDR») y posiblemente algunos residuos de marco («FR») se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Un «anticuerpo quimérico» es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiere propiedades nuevas al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento y fármaco; o (b) la región variable, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada.

Los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno de la invención incluyen además una o más cadenas de inmunoglobulina que están conjugadas químicamente a, o expresadas como, proteínas de fusión con otras proteínas. Esto también incluye un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares diferentes de cadenas ligeras/pesadas y dos sitios de unión diferentes. Otros fragmentos de unión al antígeno o porciones de anticuerpo de la invención incluyen scFv bivalente (diacuerpo), anticuerpos scFv biespecíficos en los que la molécula de anticuerpo reconoce dos epítopos diferentes, dominios de unión única (dAb) y minicuerpos.

Los diferentes anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente se pueden producir mediante la modificación química o enzimática de los anticuerpos intactos, o se pueden sintetizar *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (p. ej., Fv de cadena única) o se pueden identificar utilizando colecciones de presentación de fagos (remítase, p. ej., a McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554, 1990). Por ejemplo, los minicuerpos se pueden generar utilizando métodos descritos en la técnica, p. ej., Vaughan y Sollazzo, *Comb Chem High Throughput Screen.* 4:417-30 2001. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante varios métodos, que incluyen la fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Remítase, p. ej., a Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992). Los anticuerpos de cadena única se pueden identificar utilizando colecciones de presentación de fagos o colecciones de presentación de ribosomas, colecciones aleatorias de genes. Tales colecciones se pueden construir a partir de fuentes sintéticas, semisintéticas o nativas e inmunocompetentes.

Un «anticuerpo quimérico» es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula totalmente diferente que confiere propiedades nuevas al anticuerpo quimérico, p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de esta, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, según se muestra en los Ejemplos más adelante, un anticuerpo anti-PCSK9 de ratón se puede modificar reemplazando su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido al reemplazo con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede conservar su especificidad a la hora de reconocer PCSK9 humana a la vez que presenta una menor antigenicidad en un ser humano, en comparación con el anticuerpo de ratón original.

La expresión «molécula de unión de tipo anticuerpo» o «ligando que no es un anticuerpo» se refiere a miméticos de anticuerpos que utilizan captadores de proteínas que no son inmunoglobulinas, los cuales incluyen adnectinas, avímeros, moléculas de unión polipeptídicas de cadena única y peptidomiméticos de unión de tipo anticuerpo.

La expresión «región variable» o «región V» se refiere indistintamente a una cadena ligera o pesada que comprende FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Remítase a la Figura 1. Una región variable endógena está codificada por genes V-D-J de la cadena pesada o genes V-J de la cadena ligera de inmunoglobulina. Una región V puede ser de origen natural, recombinante o sintética.

La expresión «segmento variable» o «segmento V», tal como se utiliza en la presente, se refiere indistintamente a una subsecuencia de la región variable que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3. Remítase a la Figura 1. Un segmento V endógeno está codificado por un gen V de inmunoglobulina. Un segmento V puede ser de origen natural, recombinante o sintético.

La expresión «segmento J», tal como se utiliza en la presente, se refiere a una subsecuencia de la región variable codificada que comprende una porción C-terminal de una CDR3 y la FR4. Un segmento J endógeno está codificado por un gen J de inmunoglobulina. Remítase a la Figura 1. Un segmento J puede ser de origen natural, recombinante o sintético.

Un anticuerpo «humanizado» es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano a la vez que es menos inmunogénico en seres humanos. Esto se puede conseguir, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus homólogos humanos. Remítase, p. ej., a Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immunol.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.*, 31(3):169-217 (1994).

La expresión «secuencia de la línea germinal humana correspondiente» se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana que comparte la identidad de secuencia de aminoácidos determinada más elevada con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable de referencia en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de la región variable conocidas codificadas por secuencias de la región variable de inmunoglobulina de la línea germinal humana. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente también se puede referir a la secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana con la identidad de secuencia de aminoácidos más elevada con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable de referencia en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de la región variable evaluadas. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente puede constar de regiones de marco únicamente, regiones determinantes de la complementariedad únicamente, regiones determinantes de la complementariedad y de marco, un segmento variable (según se ha definido anteriormente) u otras combinaciones de secuencias o subsecuencias que comprendan una región variable. La identidad secuencial se puede determinar utilizando los métodos descritos en la presente, por ejemplo, alineando dos secuencias utilizando BLAST, ALIGN u otro algoritmo de alineación conocido en la técnica. La secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de la línea germinal humana correspondiente puede tener al menos aproximadamente un 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de la región variable de referencia. Las secuencias de la línea germinal humana correspondientes se pueden determinar, por ejemplo, mediante la base de datos internacional de dominio público ImMunoGeneTics (IMGT) (en la página de Internet imgt.cines.fr/) y V-base (en la página de Internet vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

La expresión «se une específicamente (o selectivamente)», cuando se utiliza en el contexto de describir la interacción entre un antígeno, p. ej., una proteína, y un anticuerpo o agente de unión derivado del anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos, p. ej., en una muestra biológica, p. ej., una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. De este modo, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno particular en una cantidad que es al menos dos veces la de referencia y no se unen sustancialmente en ninguna cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo o agente de unión en tales condiciones puede requerir que el anticuerpo o agente hayan sido seleccionados por su especificidad por una proteína particular. Según corresponda o se desee, esta selección se puede conseguir sustrayendo anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con, p. ej., moléculas de PCSK9 de otras especies (p. ej., de ratón) u otros subtipos de PCSK. Se pueden utilizar varios formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan inmunoensayos ELISA en fase sólida de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (remítase, p. ej., a Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998), para consultar una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar una inmunoreactividad específica). Habitualmente, una reacción de unión específica o selectiva producirá una señal de al menos el doble por encima de la señal de referencia y, más habitualmente, al menos de 10 a 100 veces por encima de la referencia.

La expresión «constante de disociación de equilibrio (K_D , M)» se refiere a la constante de velocidad de disociación (k_d , tiempo⁻¹) dividida por la constante de velocidad de asociación (k_a , tiempo⁻¹, M⁻¹). Las constantes de disociación de equilibrio se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención tendrán generalmente una constante de disociación de equilibrio inferior a aproximadamente 10⁻⁷ o 10⁻⁸ M, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10⁻⁹ M o 10⁻¹⁰ M, en algunas realizaciones, inferior a aproximadamente 10⁻¹¹ M, 10⁻¹² M o 10⁻¹³ M.

La expresión «región de unión al antígeno», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un dominio de la molécula de unión a PCSK9 de esta invención que es responsable de la unión específica entre la molécula y PCSK9. Una región de unión al antígeno incluye al menos una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y al menos una región variable de la cadena ligera del anticuerpo. Hay al menos una región de unión al antígeno de este tipo presente en cada molécula de unión a PCSK9 de esta invención, y cada una de las regiones de unión al antígeno pueden ser idénticas o diferentes de las demás. En algunas realizaciones, al menos una de las regiones de unión al antígeno de una molécula de unión a PCSK9 de esta invención actúa como un antagonista de PCSK9.

El término «antagonista», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un agente que es capaz de unirse específicamente a la molécula diana e inhibir su actividad. Por ejemplo, un antagonista de PCSK9 se une específicamente a PCSK9 e inhibe total o parcialmente la degradación de LDLR mediada por PCSK9. El hecho de inhibir la degradación de LDLR mediada por PCSK9 puede interferir o no con la unión de PCSK9 a LDLR. En algunos casos, un antagonista de PCSK9 se puede identificar por su capacidad de unirse a PCSK9 e inhibir la unión de PCSK9 a LDLR. La inhibición se produce cuando la degradación de LDLR mediada por PCSK9, cuando se expone a un antagonista de la invención, es al menos aproximadamente un 10% inferior, por ejemplo, al menos aproximadamente un 25%, 50%, 75% inferior o se inhibe totalmente, en comparación con la degradación mediada por PCSK9 en presencia de un control o en ausencia del antagonista. Un control se puede exponer a la ausencia de anticuerpo o molécula de unión al antígeno, a un anticuerpo o molécula de unión al antígeno que se una específicamente a otro antígeno, o a un anticuerpo o molécula de unión al antígeno anti-PCSK9 que se sabe que no actúa como antagonista. Un «antagonista que es un anticuerpo» se refiere a la situación en la que el antagonista es un anticuerpo inhibidor.

El término «PCSK9» o la expresión «proteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9» se refieren indistintamente a una proproteína convertasa humana de origen natural que pertenece a la subfamilia K de proteinasas de la familia de subtilasas secretoras. PCSK9 se sintetiza como un zimógeno soluble que experimenta un procesamiento intramolecular autocatalítico en el retículo endoplasmático y se cree que funciona como una proproteína convertasa.

5 PCSK9 desempeña una función en la homeostasis del colesterol y puede que desempeñe una función en la diferenciación de neuronas corticales. Las mutaciones en el gen PCSK9 se han asociado con una forma de hipercolesterolemia familiar dominante autosomal. Remítase, p. ej., a Burnett y Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de PCSK9 son conocidas y se han publicado en los N.ºs de acceso de GenBank NM_174936.2 y NP_777596.2, respectivamente. Tal como se utiliza en la presente, un

10 polipéptido PCSK9 se une funcionalmente a LDLR y fomenta la degradación de LDLR. Estructuralmente, una secuencia de aminoácidos de PCSK9 presenta al menos aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos del N.º de acceso de GenBank NP_777596.2. Estructuralmente, una secuencia de ácido nucleico de PCSK9 presenta al menos aproximadamente un

15 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial con la secuencia de ácido nucleico del N.º de acceso de GenBank NM_174936.2.

La expresión «mutación de PCSK9 de ganancia de función» se refiere a mutaciones naturales que ocurren en los genes PCSK9 que se asocian con y/o que provocan el fenotipo de hipercolesterolemia familiar, aterosclerosis acelerada y enfermedad coronaria prematura, p. ej., debido a una mayor degradación de LDLR y una reducción de los niveles de LDLR. La frecuencia de alelo de las mutaciones de PCSK9 de ganancia de función es poco habitual. Remítase a Burnett y Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26. Las mutaciones de PCSK9 de ganancia de función ilustrativas incluyen D129N, D374H, N425S y R496W. Remítase a Fasano *et al.*, *Atherosclerosis* (2009) 203(1):166-71. Las mutaciones de PCSK9 de ganancia de función se revisan, p. ej., en Burnett y Hooper, *supra*; Fasano *et al.*, *supra*; Abifadel *et al.*, *J Med Genet* (2008) 45(12):780-6; Abifadel *et al.*, *Hum Mutat* (2009) 30(4):520-9; y Li *et al.*, *Recent Pat DNA Gene Seq* (2009) 1 de noviembre (PMID 19601924).

20

25

La «actividad» de un polipéptido de la invención se refiere a funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de un polipéptido en su célula o tejido nativo. Los ejemplos de actividad de un polipéptido incluyen tanto actividades directas como actividades indirectas. Las actividades directas ilustrativas de PCSK9 son el resultado de la interacción directa con el polipéptido, incluida la unión a LDLR y la degradación de LDLR mediada por PCSK9. Las actividades indirectas ilustrativas en el contexto de PCSK9 se observan como un cambio en el fenotipo o la respuesta en una célula, tejido, órgano o sujeto frente a una actividad directa del polipéptido, p. ej., reducción del mayor nivel de LDLR en el hígado, menor nivel de HDL-C en plasma, menor nivel de colesterol en plasma, mejora de la sensibilidad frente a las estatinas.

30

El término «aislado», cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, denota que el ácido nucleico o la proteína está esencialmente exento de otros componentes celulares con los cuales se asocia en el estado natural. Se encuentra preferentemente en un estado homogéneo. Puede estar en una solución tanto acuosa como anhidra. La pureza y la homogeneidad se determinan habitualmente utilizando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína que sea la especie predominante presente en un preparado se encuentra sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado está separado de marcos abiertos de lectura que flanquean el gen y codifican una proteína que no sea el gen de interés. El término «purificado» denota que un ácido nucleico o proteína origina esencialmente una banda en un gel electroforético. En particular, significa que el ácido nucleico o proteína tiene una pureza de al menos un 85%, más preferentemente una pureza de al menos un 95% y de la manera más preferida una pureza de al menos el 99%.

35

40

45

La expresión «ácido nucleico» o «polinucleótido» se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y sus polímeros, ya sea en forma mono- o bicatenaria. A menos que se limite de forma específica, la expresión engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen unas propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba implícitamente variantes de esta modificadas de forma conservativa (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como también la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos ellos) se sustituye con residuos de desoxinosina y/o bases mixtas (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

50

55

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos aminoacídicos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoacídicos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como también a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos que no sean de origen natural.

60

El término «aminoácido» se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como también análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos que están codificados por el código genético, así como también aquellos

65

- aminoácidos que se modifican posteriormente, p. ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o esqueletos peptídicos modificados, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido de origen natural.
- La expresión «variantes modificadas de forma conservativa» se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Respecto a las secuencias particulares de ácido nucleico, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, en secuencias funcionalmente idénticas codifica una proteína dada cualquiera. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos ellos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina está especificada por un codón, el codón se puede alterar con cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones del ácido nucleico son «variaciones silenciadas», las cuales representan un tipo de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica un polipéptido también describe cada variación silenciada posible del ácido nucleico. Un experto reconocerá que se puede modificar cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para la metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para el triptófano) para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciada de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.
- Por lo que se refiere a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales en una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que alteren, añaden o eliminen un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada constituirán una «variante modificada de forma conservativa» en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la técnica existe gran constancia de tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de forma conservativa son, además de y sin excluir, variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención.
- Los ocho grupos siguientes contienen cada uno de ellos aminoácidos que son sustituciones conservativas los unos de los otros: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (remítase, p. ej., a Creighton, *Proteins* (1984)).
- El «porcentaje de identidad secuencial» se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (p. ej., un polipéptido de la invención), que no comprende adiciones o deleciones, para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base del ácido nucleico o el residuo aminoacídico idéntico aparece en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad secuencial.
- Los términos «idénticos» o porcentaje de «identidad», en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptido, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas secuencias. Dos secuencias son «sustancialmente idénticas» si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos aminoacídicos o nucleótidos que son los mismos (es decir, un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial a lo largo de una región especificada o, cuando no se especifica, a lo largo de toda la secuencia de una secuencia de referencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación o región designada, que se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante una alineación manual e inspección visual. La invención proporciona polipéptidos o polinucleótidos que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente, ilustrados en la presente (p. ej., las regiones variables ilustradas en cualquiera de SEQ ID NOS:1-5, 15-19 y 40-41; los segmentos variables ilustrados en cualquiera de SEQ ID NOS:27-31; las CDR ilustradas en cualquiera de SEQ ID NOS:6-14, 20-26; las FR ilustradas en cualquiera de SEQ ID NOS: 32-39; y las secuencias de ácido nucleico ilustradas en cualquiera de SEQ ID NOS:42-45). Opcionalmente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 15, 25 o 50 nucleótidos, o más preferentemente a lo largo de una región que tiene una longitud de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos, o a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. Respecto a las secuencias de aminoácidos, la identidad o identidad sustancial puede existir a lo largo de una región que tiene una longitud de al menos 5, 10, 15 o 20 aminoácidos, opcionalmente una longitud de al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 50, 75 o 100 aminoácidos, opcionalmente una longitud de al menos aproximadamente 150, 200 o 250

aminoácidos, o a lo largo de toda la longitud de la secuencia de referencia. Respecto a secuencias de aminoácidos más cortas, p. ej., secuencias de aminoácidos de 20 aminoácidos o menos, la identidad sustancial existe cuando uno o dos residuos aminoacídicos se sustituyen de forma conservativa, de acuerdo con las sustituciones conservativas definidas en la presente.

5 Para la comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de referencia y de prueba se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, cuando proceda, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros del programa por defecto o se pueden designar parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula los porcentajes de identidades secuenciales para las secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

15 Una «ventana de comparación», tal como se utiliza en la presente, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas que se selecciona del grupo constituido por de 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se hayan alineado de forma óptima. Los métodos de alineación de secuencias para su comparación son muy conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para su comparación se puede llevar a cabo, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin, Grupo computacional de genética, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (remítase, p. ej., a Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplemento)).

30 Los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales se describen en Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, y Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectivamente, son dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad secuencial y la similitud secuencial. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST es de dominio público y se puede acceder a él a través del *National Center for Biotechnology Information*. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias con una puntuación elevada (HSP, por sus siglas en inglés) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que o bien coinciden o satisfacen cierta puntuación umbral valorada positivamente T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. Se hace referencia a T como el umbral de puntuación de palabras cercanas (Altschul *et al.*, *supra*). Estos resultados iniciales de palabras cercanas actúan como semillas para iniciar búsquedas con el fin de encontrar HSP más largas que las contengan. Los resultados de las palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta tan lejos como pueda incrementarse la puntuación de alineación acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de las palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa cae fuera en una cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa se reduce hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se llega al final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza, como parámetros por defecto, una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como parámetros por defecto una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (remítase a Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas hebras.

55 El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (remítase, p. ej., a Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad con la que puede producirse por efecto del azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es inferior a aproximadamente 0.2, más preferentemente inferior a aproximadamente 0.01 y de la manera más preferida inferior a aproximadamente 0.001.

60 Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona inmunológicamente de forma cruzada con los anticuerpos originados contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, según se describe más adelante. Por lo tanto, habitualmente un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren únicamente en sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido

nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, según se describe más adelante. Otra indicación más de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que se pueden utilizar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

5 El término «unir», cuando se utiliza en el contexto de describir cómo están conectadas las regiones de unión al antígeno dentro de una molécula de unión a PCSK9 de esta invención, engloba todos los medios posibles para enlazar físicamente las regiones. La multitud de regiones de unión al antígeno están frecuentemente enlazadas mediante enlaces químicos tales como un enlace covalente (p. ej., un enlace peptídico o un enlace de tipo disulfuro) o un enlace no covalente, el cual puede ser o bien un enlace directo (es decir, sin ningún conector entre dos regiones de unión al antígeno) o un enlace indirecto (es decir, con la ayuda de al menos una molécula conectora entre dos o más regiones de unión al antígeno).

15 Los términos «sujeto», «paciente» e «individuo» se refieren indistintamente a un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un mamífero de tipo primate no humano. El mamífero también puede ser un mamífero de laboratorio, p. ej., un ratón, una rata, un conejo o un hámster. En algunas realizaciones, el mamífero puede ser un mamífero agrícola (p. ej., equino, ovino, bovino, porcino, camélido) o un mamífero doméstico (p. ej., canino, felino).

20 La expresión «cantidad terapéuticamente aceptable» o «dosis terapéuticamente eficaz» se refiere indistintamente a una cantidad suficiente para ejercer el resultado deseado (es decir, una reducción de no-HDL-C en plasma, hipercolesterolemia, aterosclerosis, enfermedad coronaria). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente aceptable no induce ni provoca efectos secundarios no deseados. Una cantidad terapéuticamente aceptable se puede determinar administrando en primer lugar una dosis baja y a continuación incrementando de forma gradual esa dosis hasta que se consiga el efecto deseado. Una «dosis profilácticamente eficaz» y una «dosis terapéuticamente eficaz» de un anticuerpo que antagoniza PCSK9 de la invención puede prevenir el inicio de, o dar como resultado una reducción en la gravedad de, respectivamente, los síntomas patológicos asociados con la presencia de PCSK9 (p. ej., hipercolesterolemia). Dichas expresiones también pueden propiciar o incrementar, respectivamente, la frecuencia y duración de periodos exentos de síntomas patológicos. Una «dosis profilácticamente eficaz» y una «dosis terapéuticamente eficaz» también pueden prevenir o mejorar, respectivamente, el deterioro o la discapacidad debidos a los trastornos y enfermedades resultantes de la actividad de PCSK9.

30 El término «coadministrar» se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que se coadministran se pueden suministrar de forma concurrente o secuencial.

35 La expresión «constituido esencialmente por», tal como se utiliza en la presente, se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o composición, así como también a cualesquiera excipientes inactivos para el fin deseado de los métodos o composiciones. En algunas realizaciones, la expresión «constituido esencialmente por» excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales que no sean un anticuerpo anti-PCSK9 antagonista de la invención. En algunas realizaciones, la expresión «constituido esencialmente por» excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales que no sean un anticuerpo anti-PCSK9 antagonista de la invención y un segundo agente coadministrado.

40 El término «estatina» se refiere a una clase de agentes farmacológicos que son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA)-reductasa.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 La **Figura 1** ilustra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO:1) y la cadena ligera (SEQ ID NO:15) del anticuerpo monoclonal de ratón progenitor NVP-LFU720. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas y en negrita.

La **Figura 2** ilustra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO:2) y la cadena ligera (SEQ ID NO:16) del anticuerpo monoclonal de ratón progenitor NVP-LGT209. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas y en negrita.

55 La **Figura 3** ilustra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO:2) y la cadena ligera (SEQ ID NO:18) del anticuerpo monoclonal de ratón progenitor NVP-LGT210. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas y en negrita.

60 La **Figura 4** ilustra las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEQ ID NO:4) y la cadena ligera (SEQ ID NO:16) del anticuerpo monoclonal de ratón progenitor NVP-LGT211. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están subrayadas y en negrita.

Las **Figuras 5A-C** ilustran un ensayo ELISA que evalúa la unión de NVP-LGT209 (A), NVP-LGT210 (B) y NVP-LGT-211 (C) en comparación con NVP-LFU720-NX-4 a varios antígenos humanos y de ratón diferentes.

Las **Figuras 6A-C** ilustran la unión de NVP-LGT209 (A), NVP-LGT210 (B) y NVP-LGT-211 (C) en un ELISA a Pcsk9 humana y de cino. El anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, con un factor de dilución de 1:5000. El 2.º únicamente es el control de únicamente anticuerpo secundario.

5 La **Figura 7** ilustra que el anticuerpo monoclonal de ratón progenitor NVP-LFU720 se une al extremo C-terminal de PCSK9, en los residuos 680-692 (RSRHQAQSQELQ; SEQ ID NO:49). Los anticuerpos Humaneered™ LGT209, LGT210 y LGT211 compiten por el mismo epítipo. Mutante C-term A685X = SEQ ID NO:56.

10 La **Figura 8** ilustra que el anticuerpo de ratón progenitor NVP-LFU720 (5P20) altera escasamente la interacción entre PCSK9 y LDL-R, según se determina en un ensayo bioquímico de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET). Por el contrario, 13C10 altera la interacción FRET de PCSK9-LDL-R con una Cl_{50} de 50 nM. La PCSK9 humana marcada con un fluoróforo (hPCSK9-AF) se incubó con NVP-LFU720-AX-1 o 13C10 en tampón de ensayo (HEPES 20 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 1 mM, 0.1% v/v de Tween 20 y 0.1% p/v de BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió LDL-R marcado con europio (hLDL-R-Eu) y se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 90 minutos, de modo que las concentraciones finales fueron de hPcsk9-AF 8 nM y hLDL-R-Eu 1 nM. Se midió la señal de TR-FRET (excitación a 330 nm y emisión a 665 nm) con un lector de placas (EnVision 2100, Perkin Elmer) y se calculó el % de inhibición en presencia de 5P20 o 13C10. Los valores de Cl_{50} se calcularon representando gráficamente los valores del porcentaje de inhibición en Prism (GraphPad). Cada punto de los datos representa la media \pm SD (n = 4 réplicas por punto). Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes.

15 La **Figura 9** ilustra que los anticuerpos Humaneered™ LGT209, LGT210 y LGT211 son equivalentes al anticuerpo de ratón LFU720 a la hora de generar unos mayores niveles de LDL-R y captación de LDL por parte de las células HepG2. Para la medición de LDL-R, las células se incubaron con anticuerpos de unión a PCSK9 y se marcaron con anticuerpos anti-LDL-R. Para la captación de LDL, las células se incubaron con anticuerpos de unión a PCSK9, PCSK9 y DiI-LDL. Los anticuerpos de LDL-R y la fluorescencia de DiI-LDL se midieron mediante citometría de flujo. Para cada ensayo, se muestra la media + SEM para mediciones por replicado. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

20 Para los ensayos de captación de LDL, los anticuerpos de unión a PCSK9 se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal deficiente en lipoproteínas (Intracel) y PCSK9 humana 200 nM (Hampton *et al.* PNAS (2007)104:14604-14609), y las soluciones de anticuerpo/PCSK9/medio se añadieron a las células en placas de 96 pocillos y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se añadió LDL marcado con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI-LDL, Biomedical Technologies) durante 2 h adicionales. A continuación, se aspiró el medio, las células se lavaron tres veces con PBS y las células se disociaron con un 0.25% de tripsina-EDTA. A continuación, las células se transfirieron a un tampón de FACS (PBS que contenía un 5% de suero bovino fetal, EDTA 2mM y un 0.2% de azida sódica), se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min, se aspiraron y se fijaron en paraformaldehído al 1%. La captación de LDL se midió mediante fluorescencia DiI celular (excitación a 488 nm y emisión a 575 nm) utilizando citometría de flujo (Becton Dickinson LSR II). Para los ensayos de LDL-R de superficie, las células se incubaron con medio exento de suero que contenía anticuerpos, se lavaron con PBS y se recolectaron en Versine (Biowhittaker, 17-771E) y tampón de FACS. Las células se transfirieron a placas nuevas, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 m y se bloquearon con IgG de conejo normal (MP biomedical). Las células se marcaron con anticuerpos marcados de IgG anti-hLDL-R-Alexa 647 de conejo (5 μ g/ml) en tampón FACS, se centrifugaron, se lavaron y se fijaron en paraformaldehído al 1%. El LDL-R de superficie se midió mediante citometría de flujo (excitación de 488 nm y emisión de 633 nm). Los valores de CE50 se calcularon utilizando Prism (GraphPad).

25 La **Figura 10** proporciona una representación esquemática del diseño del estudio para el modelo de ratón de infusión de PCSK9 humana con el fin de determinar el efecto de reducción de colesterol de los anticuerpos de la presente. LGT209, LGT210 y LGT211 son anticuerpos Humaneered™ anti-PCSK9 que se unen con una afinidad elevada a hPCSK9 sin unión detectable a PCSK9 de murino. Para evaluar si LGT209, LGT210 o LGT211 podrían tanto inhibir la elevación mediada por hPCSK9 de colesterol no-HDL como prevenir la degradación mediada por PCSK9 de LDLR hepático, los anticuerpos se inyectaron, cada uno de ellos, en ratones 3 h antes del implante osmótico con una minibomba que contenía hPCSK9 (para una infusión continua). La recolección de tejido hepático y de plasma se llevó a cabo 24 h después de la inyección de hPCSK9.

30 La **Figura 11** muestra que el tratamiento con los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 dio como resultado una acumulación de PCSK9 humana («hPCSK9») en el modelo de infusión de ratón. En resumen, se midió la hPCSK9 total mediante ELISA utilizando mAb 7D16 para la captura. mAb 7D16 se une a un epítipo diferente en PCSK9 en comparación con LGT209, LGT210 y LGT211 y se puede utilizar para medir la PCSK9 total (unida y libre). El incremento observado en hPCSK9 total se debe presuntamente a un incremento en los complejos de hPCSK9/Ab. El anticuerpo libre se midió mediante ELISA utilizando hPCSK9 para la captura. Este ensayo midió el anticuerpo «libre» y posiblemente mide los complejos de Ab:PCSK9 1:1. Se trataron ratones C57BL/6 con vehículo únicamente, PCSK9 únicamente, PCSK9 + 20 mg/kg de LGT210, PCSK9 + 20 mg/kg de NVP-LGT211 o una mezcla de IgG no específicas de ratón (control negativo). Los puntos de datos individuales se representan en una gráfica y el valor medio se marca con una barra horizontal; se consideró $p < 0.05$ como significativo.

Los niveles de IgG en plasma se cuantificaron mediante un ensayo de *Meso Scale Discovery* (MSD). El anticuerpo libre se midió utilizando hPCSK9 para la captura. Este ensayo midió el anticuerpo «libre» y posiblemente mide los complejos de Ab:PCSK9 1:1. Para el ensayo MSD de IgG, se utilizaron 96 placas estándar de MSD (L11XA-3). En resumen, se recubrieron las placas con 25-28 μ l de antígeno de captura, PCSK9-His, 1 μ g/ml en PBS (25-28 ng/pocillo) durante toda la noche a 4 °C. Se retiró la solución de recubrimiento y las placas se bloquearon con 150 μ l/pocillo de bloqueador A de MSD al 5% (R93AA-2) agitando durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar la placa con PBS + 0.05% de Tween-20, 300 μ l x 3 veces, se añadieron 25 μ l de diluciones de calibrador de IgG (10 diluciones en serie con el bloqueador A de MSD desde 10 000 hasta 0.0003 ng/ml), diluciones de las muestras en plasma desconocidas (10 000X con bloqueador A de MSD) o muestras de control de calidad, y se incubaron con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadieron 25 μ l/pocillo de anticuerpo de detección de concentración 1 μ g/ml (anticuerpo de detección de cabra anti-IgG de ratón marcado con SULFO-TAG de MSD, R32AC-5, diluido con 1% de BSA / PBS / 0.05% de Tween 20) y se incubó con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar y añadir 150 μ l/pocillo de 1X tampón de lectura T, la placa se leyó inmediatamente en un generador de imágenes SECTOR 6000 de MSD. Se calculó una gráfica de la curva estándar y las muestras desconocidas utilizando el software de análisis de datos de MSD.

Se cuantificaron tanto los niveles de IgG como de hPCSK9 en plasma mediante un ensayo de *Meso Scale Discovery* (MSD). El ensayo de MSD para hPCSK9 es similar al ensayo para IgG, pero con las siguientes excepciones. Las placas se recubrieron con 25-28 μ l de anticuerpo de captura (7D16.C3: 2.95 mg/ml) con una concentración de 1 μ g/ml. mAb 7D16 se une a un epítipo diferente en PCSK9 en comparación con LGT209, LGT210 y LGT211 y se puede utilizar para medir la PCSK9 total (unida y libre). Después de bloquear las placas, se incubaron 25 μ l de diluciones de calibrador de hPCSK9 (10 puntos desde 10 000 hasta 0.0003 ng/ml) y diluciones de las muestras en plasma (10 000X con bloqueador A de MSD) con agitación durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se incubaron con anticuerpo de detección primario (anticuerpo policlonal de conejo anti-PCSK9, Ab4, conejo interno ID #RB11835). Se añadió un paso de incubación con un anticuerpo de detección secundario (anticuerpo de detección de cabra anti-IgG de conejo marcado con SULFO-TAG de MSD, R32AB-5) antes de realizar la lectura con el generador de imágenes SECTOR 6000 de MSD. El incremento observado en hPCSK9 total se debe presuntamente a un incremento en los complejos de hPCSK9/Ab. Se realizó un análisis estadístico utilizando GraphPad Prism 4.02 (software GraphPad, San Diego, CA). Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar las diferencias de los grupos y, cuando se encontraron diferencias globales, se utilizó la prueba de Newman-Keuls *post hoc* para determinar las diferencias específicas entre los grupos tratados.

La **Figura 12** ilustra que los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 proporcionaron protección de LDL-R hepático frente a la degradación mediada por hPCSK9 en el modelo de infusión de ratón. Se trataron ratones C57BL/6 con vehículo únicamente, PCSK9 únicamente, PCSK9 + 20 mg/kg de LGT210, PCSK9 + 20 mg/kg de NVP-LGT211 o una mezcla de IgG no específicas de ratón (control negativo). Se muestran las muestras de hígado procedentes de animales individuales.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras de membrana en plasma utilizando un gel de Bis-Tris Invitrogen Midi al 4-12% de 20 líneas (Invitrogen WG1402BX10) con tampón de análisis de MOPS (Invitrogen NP0001). Las muestras preparadas se calentaron a 70 °C durante 10 minutos, se colocaron sobre hielo y a continuación se utilizó un pipeteador multicanal Matrix para introducir 10 μ l de cada muestra en un gel. Se añadieron marcadores SeeBlue Plus2 (Invitrogen LC5925) junto a las muestras para la determinación del tamaño y la orientación del gel. Los geles se analizaron con un voltaje constante de 200V hasta que el frente de tinte alcanzó el fondo del gel. Después de la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen IB3010-01) utilizando una unidad iBlot (Invitrogen IB1001EU). La transferencia se llevó a cabo a 20 V durante 7 min. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con Pierce Superblock T20 (Pierce 37536) durante al menos 30 min. Las membranas se colocaron en bolsas para el envasado de comida «seal-a-meal» y a continuación se añadió una dilución 1:500 de anticuerpo de conejo anti-LDLR en Superblock antes de realizar una incubación a 4 °C durante toda la noche con agitación. Las membranas se lavaron con TBS/0.05% de Tween 5 veces durante 5 minutos con agitación y a continuación se añadió una dilución de 1:30 000 de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo con HRP en Superblock a las membranas durante 1h. Las membranas se volvieron a lavar con TBS/0.05% de Tween 5 veces durante 5 minutos con agitación. El conjugado de HRP se detectó utilizando un sustrato quimioluminiscente Pierce SuperSignal West Pico (Pierce 37079) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezclaron partes iguales de solución de peróxido y solución de luminol/potenciador y se añadieron a las membranas (0.2 ml/cm²) durante 5 min. Se retiró el exceso de solución mediante absorción y las membranas se expusieron a una película de rayos X Kodak BioMax MR (Kodak 870 1302) para la exposición.

Las **Figuras 13A-C** ilustran que los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 proporcionaron una reducción en el colesterol no-HDL en plasma en el modelo de infusión de hPCSK9 de ratón. La preinyección del anticuerpo LGT209 dio como resultado una protección de un 46% frente a la elevación mediada por hPCSK9 del colesterol no-HDL. La preinyección de LGT210 o LGT211 dio como resultado una protección equivalente o superior frente a la elevación mediada por hPCSK9 del colesterol no-HDL. 13C10 es un anticuerpo anti-PCSK9 de murino validado que se une con una afinidad elevada a hPCSK9 y se utilizó como control positivo para este ensayo. Se trataron ratones C57BL/6 con vehículo únicamente, PCSK9 únicamente, PCSK9 + 20 mg/kg de LGT209, PCSK9 + 20 mg/kg de LGT210, PCSK9 +

20 mg/kg de NVP-LGT211, PCSK9 + 20 mg/kg de 13C10 o una mezcla de IgG no específicas de ratón (control negativo). Los valores individuales se muestran con el valor medio marcado como una barra horizontal. Para cuantificar el nivel de colesterol total en plasma, se utilizó un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc.: Olympus AU400). Las muestras en plasma se diluyeron con un factor de 1:3 en ddH₂O y se cuantificaron 40 µl de las muestras en plasma diluidas para determinar el nivel de colesterol total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cuantificar HDL y no-HDL en plasma, se obtuvieron fracciones de colesterol lipoproteico utilizando Spife 3000 de Helena Laboratories. Todos los procedimientos, incluida la preparación de las muestras, preparación de los geles, aplicación de las muestras, electroforesis en gel, tinción, lavado y secado, se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones proporcionadas en el manual del operador. A continuación, el gel se escaneó en el Quick Scan 2000 utilizando Slit 5 y el porcentaje relativo de las fracciones de colesterol lipoproteico se calculó utilizando un densitómetro Helena. Finalmente, los valores absolutos de HDL y no-HDL se calcularon multiplicando el porcentaje de cada fracción y los niveles de colesterol total.

La **Figura 14** ilustra los perfiles farmacocinéticos (PK) en rata para los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 (con IgG1 humana silenciada) en comparación con un perfil (PK) «típico» de IgG1. La semivida de los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 es considerablemente más prolongada (7-13 días) en comparación con una semivida típica de IgG1 (aproximadamente 6 días) (p. ej., según se determina en un sujeto humano). No se observó ninguna evidencia de disposición mediada por la diana (TMD, por sus siglas en inglés), lo cual indica que los anticuerpos no reaccionaron de forma cruzada con PCSK9 de roedor. Para cada anticuerpo de prueba, se inyectaron 10 mg/kg en 3 ratas Lewis macho. En los puntos de evaluación = 0, 1, 6, 24 h, 2, 4, 8 y 16 días, se tomaron muestras de 250 µl de sangre y el plasma aclarado se diluyó y se evaluó en un ELISA de captura (anti-IgG humana de cabra) para medir el anticuerpo humano total recuperado. También se generó una curva estándar para cada anticuerpo de prueba. La cantidad de la IgG recuperada se representó en una gráfica frente a la recuperación esperada de una IgG humana típica en una rata.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

1. Introducción

Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno de la presente invención se unen específicamente a la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9a («PCSK9»). Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la presente se unen al extremo C-terminal de PCSK9 y presentan la propiedad inesperada de interferir con la degradación mediada por PCSK9 del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) sin interferir con la unión de PCSK9 a LDL-R. En particular, los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 se unen a un epítipo dentro de los residuos 680-692 de PCSK9, por ejemplo, un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:49), que se localiza en el extremo C-terminal de PCSK9. Debido a que los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno de la invención se unen a PCSK9 mientras está enlazada en una célula en lugar de únicamente a PCSK9 circulante, presentan una semivida *in vivo* comparativamente más prolongada en un paciente, p. ej., de al menos aproximadamente 7 días o más prolongada, y en algunas realizaciones proporcionan efectos reductores de lípidos durante al menos 2 semanas tras la administración. Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención son antagonistas de PCSK9 en el sentido de que previenen, reducen y/o inhiben la degradación de LDL-R mediada por PCSK9, con lo que fomentan una mayor recaptación de colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL-C). Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 tienen aplicación en el tratamiento de sujetos que padecen, p. ej., dislipidemia, hipercolesterolemia, trigliceridemia y otras afecciones patológicas mediadas por PCSK9.

2. Anticuerpos anti-PCSK9 mejorados en general

Los fragmentos de anticuerpos anti-PCSK9 se pueden producir mediante cualesquiera medios conocidos en la técnica, que incluyen, sin carácter limitante, expresión recombinante, síntesis química y digestión enzimática de tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa se puede obtener, p. ej., mediante producción recombinante o de hibridomas. La expresión recombinante puede proceder de cualesquiera células hospedadoras adecuadas conocidas en la técnica, por ejemplo, células hospedadoras de mamífero, células hospedadoras bacterianas, células hospedadoras de levadura, células hospedadoras de insecto, etc. Cuando estén presentes, las regiones constantes de los anticuerpos anti-PCSK9 pueden ser de cualquier tipo o subtipo, según proceda, y se pueden seleccionar para que sean de la especie del sujeto que se ha de tratar con los métodos de la presente (p. ej., ser humano, primate no humano u otro mamífero, por ejemplo, mamífero agrícola (p. ej., equino, ovino, bovino, porcino, camélido), mamífero doméstico (p. ej., canino, felino) o roedor (p. ej., rata, ratón, hámster, conejo). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 son humanizados o Humaneered™. En algunas realizaciones, el isotipo de la región constante es IgG, por ejemplo, IgG1. En algunas realizaciones, la región constante de IgG1 humana está mutada para que tenga una menor afinidad de unión por un ligando efector tal como un receptor Fc (FcR), p. ej., Fc gamma R1, en una célula o el componente C1 del complemento. Remítase, p. ej., a la Patente de EE. UU. N.º 5 624 821. Los anticuerpos que contienen tales mutaciones median una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) reducida o nula. En algunas realizaciones, los residuos aminoacídicos L234 y L235 de la región constante de

IgG1 se sustituyen por Ala234 y Ala235. La numeración de los residuos en la región constante de la cadena pesada es la del índice EU (remítase a Kabat *et al.*, (1983) "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", Departamento de Servicios Humanos y Sanitarios de los EE. UU.). Remítase también, p. ej., a Woodle *et al.*, *Transplantation* (1999) 68(5):608-616; Xu *et al.*, *Cell Immunol* (2000) 200(1):16-26; y Hezareh *et al.*, *J Virol* 75(24):12161-8.

Los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención también incluyen unidades de unión al antígeno de dominio único que tienen un captador de tipo camélido. Los animales en la familia de los camélidos incluyen camellos, llamas y alpacas. Los camélidos producen anticuerpos funcionales que carecen de cadenas ligeras. El dominio variable de la cadena pesada (VH) se pliega de forma autónoma y funciona independientemente como una unidad de unión al antígeno. Su superficie de unión implica únicamente tres CDR en comparación con las seis CDR en moléculas de unión al antígeno clásicas (Fab) o fragmentos variables de cadena única (scFv). Los anticuerpos de los camélidos son capaces de conseguir afinidades de unión comparables a las de los anticuerpos convencionales. Las moléculas anti-PCSK9 basadas en un captador de camélido con especificidades de unión de los anticuerpos anti-PCSK9 que se ilustran en la presente se pueden producir utilizando métodos muy conocidos en la técnica, p. ej., Dumoulin *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 11:500-515, 2002; Ghahroudi *et al.*, *FEBS Letters* 414:521-526, 1997; y Bond *et al.*, *J Mol Biol.* 332:643-55, 2003.

Los anticuerpos anti-PCSK9 mejorados de la invención son anticuerpos humanos modificados genéticamente con secuencias de la región V que tienen una identidad de la secuencia de aminoácidos sustancial respecto a secuencias de la región V de la línea germinal humana a la vez que conservan la especificidad y afinidad de un anticuerpo de referencia. Remítase, p. ej., a la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2005/0255552 y la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2006/0134098. El proceso de mejora identifica la información mínima de la secuencia requerida para determinar la especificidad de unión al antígeno a partir de la región variable de un anticuerpo de referencia, y transfiere esta información a una colección de secuencias génicas de la región V parciales humanas para generar una colección enfocada en el epítipo de regiones V de anticuerpos humanos. Se puede utilizar un sistema de secreción basado en microbios para expresar miembros de la colección como fragmentos Fab de anticuerpos y la colección se criba para determinar Fab de unión al antígeno, por ejemplo, utilizando un ensayo de unión de transferencia de colonias. Remítase, p. ej., a la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2007/0020685. Los clones positivos se pueden caracterizar adicionalmente para identificar aquellos que presenten la afinidad más elevada. Los Fab humanos modificados genéticamente resultantes conservan la especificidad de unión del anticuerpo anti-PCSK9 de referencia progenitor, habitualmente presentan una afinidad equivalente o superior por el antígeno en comparación con el anticuerpo progenitor, y tienen regiones V con un elevado grado de identidad secuencial en comparación con la regiones V del anticuerpo de la línea germinal humana.

El determinante de la especificidad de unión (BSD, por sus siglas en inglés) mínimo requerido para generar la colección centrada en epítipos está representado habitualmente por una secuencia dentro de la CDR3 de la cadena pesada («CDRH3») y una secuencia dentro de la cadena ligera de la CDR3 («CDRL3»). El BSD puede comprender una porción o la longitud completa de una CDR3. El BSD puede estar compuesto por residuos aminoacídicos contiguos o no contiguos. En algunos casos, la colección centrada en epítipos se construye a partir de secuencias de segmentos V humanos unidas a la región CDR3-FR4 única del anticuerpo de referencia que contiene el BSD y secuencias de segmentos J de la línea germinal humana (remítase a la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2005/0255552). Como alternativa, las colecciones de segmentos V humanos se pueden generar mediante el reemplazo de casetes secuenciales en el que se reemplaza inicialmente tan solo parte del segmento V del anticuerpo de referencia por una colección de secuencias humanas. Los «casetes» humanos identificados que soportan la unión en el contexto de secuencias de aminoácidos residuales del anticuerpo de referencia se recombinan a continuación en un segundo cribado de la colección para generar segmentos V completamente humanos (remítase a la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2006/0134098).

En cada caso, los segmentos J, segmentos CDR3-FR4 o segmentos de CDR3 de la cadena ligera y pesada apareados, que contienen determinantes de la especificidad del anticuerpo de referencia, se utilizan para restringir la especificidad de unión de modo que los elementos de unión al antígeno obtenidos a partir de la colección conserven la especificidad por el epítipo del anticuerpo de referencia. Se pueden introducir cambios de maduración adicionales en las regiones CDR3 de cada cadena durante la construcción de la colección con el fin de identificar anticuerpos con cinéticas de unión óptimas. Los anticuerpos humanos modificados genéticamente resultantes tienen secuencias de segmentos V derivadas de colecciones de la línea germinal humana, conservan la secuencia de BSD corta de dentro de las regiones CDR3 y tienen regiones de marco 4 (FR4) de la línea germinal humana.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 contienen un determinante de la secuencia de unión (BSD) mínimo dentro de la CDR3 de las cadenas ligera y pesada que deriva del anticuerpo monoclonal de referencia u originario. Las secuencias restantes de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada (CDR y FR), p. ej., el segmento V y el segmento J, proceden de la línea germinal humana correspondiente y las secuencias de aminoácidos maduras por afinidad. Los segmentos V se pueden seleccionar a partir de una colección de segmentos V humanos. Se puede realizar un refinamiento de la secuencia adicional mediante una maduración por afinidad.

- 5 En otra realización, las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos anti-PCSK9 contienen un segmento V humano procedente de la secuencia de la línea germinal humana correspondiente (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3), p. ej., seleccionado a partir de una colección de segmentos V humanos, y un segmento de secuencia CDR3-FR4 procedente del anticuerpo monoclonal originario. El segmento de secuencia CDR3-FR4 se puede refinar adicionalmente reemplazando los segmentos de la secuencia con secuencias de la línea germinal humana correspondientes y/o mediante maduración por afinidad. Por ejemplo, la secuencia de FR4 y/o CDR3 que rodea al BSD se puede reemplazar con la secuencia de la línea germinal humana correspondiente, mientras que el BSD de la CDR3 del anticuerpo monoclonal originario se conserva.
- 10 En algunas realizaciones, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento V de la cadena pesada es Vh1-02. En algunas realizaciones, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento J de la cadena pesada es JH4. En algunas realizaciones, el segmento J de la cadena pesada comprende la secuencia parcial JH4 de la línea germinal humana WGQGLVTVSS (SEQ ID NO:50). El segmento J de longitud completa procedente de JH4 de la línea germinal humana es YFDYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:51). Los genes de región variable se denominan de acuerdo con la nomenclatura estándar para genes de región variable de inmunoglobulina. La información actual sobre genes de inmunoglobulina se encuentra disponible en Internet, por ejemplo, en las bases de datos ImMunoGeneTics (IMGT), V-base y PubMed. Remítase también a Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(2):100-16; Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(3):161-74; *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(4):242-54; y Giudicelli *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1 de enero de 2005; 33 (publicación de la base de datos):D256-61.
- 15 En algunas realizaciones, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento V de la cadena ligera es VK3 L6. En algunas realizaciones, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento J de la cadena ligera es Jk2. En algunas realizaciones, el segmento J de la cadena ligera comprende la secuencia parcial Jk2 de la línea germinal humana FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:52). El segmento J de longitud completa procedente de Jk2 de la línea germinal humana es YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:53).
- 20 En algunos casos, el segmento V de la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS(D/T)MYMSWVRQAPGQGLEWMGRID PAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFK(A/G)RVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCA R (SEQ ID NO:28). En algunos casos, el segmento V de la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPA NEHTNYAQKFGQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO:27).
- 30 En algunos casos, el segmento V de la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos (E/Q)IV(L/M)TQSPATLSVSPGERATLSC(R/S)AS(Q/S)SVSYMHWYQQKPGQAPRLLI Y(G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T)GIPDRFSGSGSGTDFLTITIGRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:31). En algunos casos, el segmento V de la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGIP DRFSGSGSGTDFLTITIGRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:29). En algunos casos, el segmento V de la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad secuencial respecto a la secuencia de aminoácidos EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGI PDRFSGSGSGTDFLTITIGRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:30).
- 35 En algunos casos:
- 50 i) la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14); y
- 55 ii) la región variable CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).
- En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es como se menciona en las reivindicaciones y:
- 60 i) la CDR3 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13; y
- ii) la CDR3 de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
- 65 En algunos casos, los anticuerpos de la divulgación comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos (D/T)MYMS (SEQ ID NO:8); una CDR2 que

comprende una secuencia de aminoácidos RIDPAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFQ(A/G) (SEQ ID NO:11); y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14).

5 En algunos casos, los anticuerpos de la divulgación comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos (R/S)AS(Q/S)SVSYM (SEQ ID NO:22); una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos (G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T) (SEQ ID NO:25); y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

10 En algunas realizaciones, la región variable de la cadena pesada comprende una FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32; una FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33; una FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34; y una FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35. Las secuencias de aminoácidos identificadas pueden tener uno o más aminoácidos que han sido sustituidos (p. ej., en una maduración por afinidad) o uno o más aminoácidos que han sido sustituidos de forma conservativa.

15 En algunas realizaciones, la región variable de la cadena ligera comprende una FR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36; una FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37; una FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:38; y una FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:39. Las secuencias de aminoácidos identificadas pueden tener uno o más aminoácidos que han sido sustituidos (p. ej., en una maduración por afinidad) o uno o más aminoácidos que han sido sustituidos de forma conservativa.

20 A lo largo de su longitud completa, las regiones variables de los anticuerpos anti-PCSK9 de la presente invención presentarán por lo general una identidad de la secuencia de aminoácidos de la región variable global (p. ej., FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) de al menos aproximadamente un 85%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% respecto a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la línea germinal humana correspondiente. Por ejemplo, la cadena pesada de los anticuerpos anti-PCSK9 puede presentar al menos aproximadamente un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a la región variable Vh1-02 de la línea germinal humana. La cadena ligera de los anticuerpos anti-PCSK9 puede presentar al menos aproximadamente un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a la región variable VK3 L6 de la línea germinal humana. En algunas realizaciones, solo se añaden, suprimen o sustituyen aminoácidos comprendidos dentro de las regiones de marco. En algunas realizaciones, la comparación de identidades secuenciales excluye la CD3.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden una región variable de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:40 y comprenden una región variable de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:41 (es decir, secuencias consenso).

30 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden una región variable de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:1 y comprenden una región variable de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:15 (es decir, LFU720 de ratón).

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden una región variable de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:2 y comprenden una región variable de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:16 (es decir, LGT-209).

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden una región variable de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:2 y comprenden una región variable de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:18 (es decir, LGT-210).

45 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden una región variable de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable

de la cadena pesada de SEQ ID NO:4 y comprenden una región variable de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:16 (es decir, LGT-211).

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden un polipéptido de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:3 y comprenden un polipéptido de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos
10 respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:17 (es decir, LGT-209).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden un polipéptido de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la
15 cadena pesada de SEQ ID NO:3 y comprenden un polipéptido de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:19 (es decir, LGT-210).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención son como se mencionan en las reivindicaciones y comprenden un polipéptido de la cadena pesada que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la
20 cadena pesada de SEQ ID NO:5 y comprenden un polipéptido de la cadena ligera que presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto a una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:17 (es decir, LGT-211).

25 Para secuencias de aminoácidos identificadas con una longitud inferior a 20 aminoácidos, se pueden tolerar una o dos sustituciones conservativas de residuos aminoacídicos a la vez que se sigue manteniendo la actividad antagonista y/o de unión específica deseada.

30 Los anticuerpos anti-PCSK9 de la presente invención se unirán a PCSK9 generalmente con una constante de disociación de equilibrio (K_D) inferior a aproximadamente 10^{-8} M o 10^{-9} M, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10^{-10} M o 10^{-11} M, en algunas realizaciones, inferior a aproximadamente 10^{-12} M o 10^{-13} M.

35 Los anticuerpos anti-PCSK9 se pueden opcionalmente multimerizar y utilizarse de acuerdo con los métodos de esta invención. Los anticuerpos anti-PCSK9 pueden ser un anticuerpo tetramérico de longitud completa (es decir, con dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas), un anticuerpo de cadena única (p. ej., un scFv) o una molécula que comprende fragmentos de anticuerpo que forman uno o más sitios de unión al antígeno y confieren especificidad de unión a PCSK9, p. ej., que comprende regiones variables de la cadena ligera y pesada (por ejemplo, Fab' u otros fragmentos similares).

40 La divulgación proporciona además polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente, p. ej., polinucleótidos que codifican regiones variables de la cadena ligera o pesada o segmentos que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad según se describen en la presente. En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,
45 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 y SEQ ID NO:54. En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45 y SEQ ID NO:55.

50 En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO:42. En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%,
55 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO:45 (es decir, LGT-209).

En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido
60 seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:42. En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:44 (es decir, LGT-210).

65 En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:43. En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena

ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO:45 (es decir, LGT-211).

5 En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena pesada presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO:54. En algunos casos, el polinucleótido que codifica la cadena ligera presenta al menos un 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO:55 (es decir, LFU720 de ratón).

10

3. Ensayos para identificar anticuerpos anti-PCSK9

Los anticuerpos antagonistas se pueden identificar generando anticuerpos anti-PCSK9 y a continuación evaluando cada anticuerpo con el fin de determinar su capacidad para reducir o inhibir eventos mediados por PCSK9, p. ej., la unión a LDLR, el fomento de la degradación de LDLR. Los ensayos se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*. Los anticuerpos preferidos se unen a PCSK9, no evitan que PCSK9 se una a LDLR, y reducen o inhiben la degradación de LDLR mediada por PCSK9.

15

La unión de los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno a PCSK9 se puede determinar utilizando cualquier método conocido en la técnica, que incluye, sin carácter limitante, ELISA, Biacore e inmunotransferencia de Western.

20

La degradación de LDLR mediada por PCSK9 también se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. En una realización, la capacidad del anticuerpo o molécula de unión al antígeno anti-PCSK9 para inhibir la degradación de LDLR se determina utilizando un modelo de infusión de ratón. Los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 se infunden por vía intravenosa (p. ej., 3 µg/hora) en un ratón y se determinan los niveles de LDLR en preparados de membrana hepática en comparación con los niveles de LDLR en preparados de membrana hepática procedentes de un ratón que ha recibido infusiones intravenosas de un anticuerpo de control (p. ej., que se une a un antígeno no relacionado). Los ratones que han recibido anticuerpos anti-PCSK9 antagonistas presentarán unos niveles detectablemente superiores de LDLR, p. ej., al menos un 10%, 20%, 50%, 80%, 100% más elevados, en comparación con ratones que han recibido el anticuerpo de control.

25

30

Los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 también se pueden evaluar para determinar su eficacia terapéutica a la hora de reducir los niveles en plasma de LCL-C, no-HDL-C y/o colesterol total. Los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 se infunden por vía intravenosa (p. ej., 3 µg/hora) en un mamífero (p. ej., ratón, rata, primate no humano, ser humano) y se determinan los niveles en plasma de LCL-C, no-HDL-C y/o colesterol total en comparación con los niveles en plasma de LCL-C, no-HDL-C y/o colesterol total procedentes del mismo mamífero antes del tratamiento o procedentes de un mamífero que ha recibido infusiones intravenosas de un anticuerpo de control (p. ej., que se une a un antígeno no relacionado). El mamífero que ha recibido los anticuerpos anti-PCSK9 antagonistas presentará unos niveles en plasma detectablemente inferiores de LCL-C, no-HDL-C y/o colesterol total, p. ej., al menos un 10%, 20%, 50%, 80%, 100% más bajos, en comparación con el mamífero antes del tratamiento o el mamífero que ha recibido el anticuerpo de control.

35

40

4. Composiciones que comprenden anticuerpos anti-PCSK9

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la presente formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente otros agentes terapéuticos que sean adecuados para tratar o prevenir un trastorno dado. Los portadores farmacéuticos mejoran o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles.

45

50

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante varios métodos conocidos en la técnica. La vía y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, o que se administre de forma próxima al sitio de la diana. El portador farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, intranasal, por inhalación, espinal o epidérmica (p. ej., mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede estar recubierto por un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que podrían desactivar el compuesto.

55

60

Los anticuerpos, solos o combinados con otros componentes adecuados, se pueden convertir en formulaciones de aerosol (es decir, se pueden «nebulizar») para ser administrados por inhalación. Las formulaciones de aerosol se pueden colocar en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

65

En algunas realizaciones, la composición es estéril y fluida. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con métodos muy conocidos y practicados de forma rutinaria en la técnica. Los portadores farmacéuticamente aceptables vienen determinados en parte por la composición particular que se esté administrando, así como también por el método particular utilizado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una gran variedad de formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Se pueden consultar métodos aplicables para formular los anticuerpos y determinar la dosis y el programa adecuados, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21.^a Ed., Universidad de Ciencias de Filadelfia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005); y en *Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, Londres: Pharmaceutical Press., y en *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 31.^a Edición, 1996, Amer Pharmaceutical Assn, y *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las composiciones farmacéuticas se elaboran preferentemente en condiciones de GMP. Habitualmente, en las composiciones farmacéuticas de la invención se emplea una dosis terapéuticamente efectiva o eficaz del anticuerpo anti-PCSK9. Los anticuerpos anti-PCSK9 se formulan en formas farmacéuticas que sean farmacéuticamente aceptables utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). A la hora de determinar una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz, se puede administrar una dosis baja y a continuación incrementarla de forma gradual hasta que se consiga una respuesta deseada con unos efectos secundarios no deseados mínimos o nulos. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar de forma proporcional la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente favorable formular composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para conseguir una administración sencilla y uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria, tal como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se han de tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociada con el portador farmacéutico requerido.

Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden modificar con el fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado depende de diversos factores farmacocinéticos, que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o amida de estas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el género, el peso, la afección, el estado general de salud y el historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacológicas comprenden una mezcla del anticuerpo o molécula de unión al antígeno anti-PCSK9 y un segundo agente farmacológico. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un anticuerpo o molécula de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención y un agente conocido por ser beneficioso a la hora de reducir el colesterol, que incluye LDL-C, no-HDL-C y colesterol total, y/o aumentar HDL-C.

Los segundos agentes ilustrativos que se pueden incluir en las mezclas con el anticuerpo o molécula de unión al antígeno antagonista anti-PCSK9 de la presente incluyen, sin carácter limitante, un inhibidor de la HMG-CoA-reductasa (es decir, una estatina), fibratos (p. ej., clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato), niacina y sus análogos, inhibidores de la absorción de colesterol, captadores de ácido biliar (p. ej., colestiramina, colestipol, colesvelam), un inhibidor del transporte ileal de ácido biliar (IBAT), un mimético de la hormona de la tiroides (p. ej., el compuesto KB2115), un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP), un agonista dual alfa y gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), un inhibidor de la acil-CoA:diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), un inhibidor de la acil-CoA:colesterol-aciltransferasa (ACAT), un inhibidor Niemann Pick C1-tipo 1 (NPC1-L1) (p. ej., ezetimiba), un agonista de las proteínas del casete de unión a ATP (ABC) G5 o G8, un inhibidor de las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), un ácido nucleico inhibidor que tenga PCSK9 como diana y un ácido nucleico inhibidor que tenga apoB100 como diana. Los agentes reductores de lípidos son conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11.^a Ed., Brunton, Lazo y Parker, Eds., McGraw-Hill (2006); *2009 Physicians' Desk Reference (PDR)*, por ejemplo, en la 63.^a (2008) Eds., Thomson PDR.

Otros agentes reductores de lípidos que se pueden utilizar en las composiciones de la presente se describen y/o revisan en, p. ej., Chang *et al.*, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop *et al.*, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays y Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda y Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum *et al.*, *Adv Cardiol* (2008)

45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh *et al.*, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch *et al.*, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; y Baxter y Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320.

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se proporcionan como una mezcla con una estatina. Las estatinas ilustrativas incluyen, sin carácter limitante, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se proporcionan como una mezcla con un agente farmacológico que induce hipercolesterolemia o trigliceridemia. Por ejemplo, el segundo agente farmacológico puede ser un inhibidor de proteasas, por ejemplo, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudina-zidovudina (Trizivir). En algunas realizaciones, el segundo agente farmacológico es Tacrolimus.

15

5. Métodos de utilización de los anticuerpos anti-PCSK9

a. Afecciones que se pueden someter a tratamiento con anticuerpos anti-PCSK9

20 Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno antagonistas anti-PCSK9 de la invención tienen aplicación en el tratamiento de cualquier afección patológica mediada por la actividad o sobreactividad de PCSK9.

Por ejemplo, los individuos que padecen o corren el riesgo de desarrollar dislipidemia o hipercolesterolemia por cualquier número de razones o etiologías se pueden beneficiar de la administración de los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno antagonistas anti-PCSK9 de la presente. Por ejemplo, el individuo puede padecer hipercolesterolemia homocigótica o heterocigótica familiar o transmitida genéticamente en la que esté presente un LDL-R funcional. Las mutaciones genéticas que provocan y/o se asocian con hipercolesterolemia familiar o heredada genéticamente se resumen, p. ej., en Burnett y Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26. El individuo también puede padecer otras afecciones patológicas o tener comportamientos que contribuyan o incrementen el riesgo de desarrollar dislipidemia o hipercolesterolemia. Por ejemplo, el individuo puede ser obeso o padecer diabetes o síndrome metabólico. El individuo puede ser fumador, llevar un estilo de vida sedentario o tener una dieta rica en colesterol.

25

30

El hecho de tener PCSK9 como diana es útil para la reducción, anulación, inhibición o prevención de la dislipidemia, hipercolesterolemia y trigliceridemia posprandial. Remítase, p. ej., a Le May *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29(5):684-90; Seidah, *Expert Opin Ther Targets* (2009) 13(1):19-28; y Poirier *et al.*, *J Biol Chem* (2009) PMID 19635789. Por consiguiente, la administración de los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno antagonistas anti-PCSK9 de la presente tiene aplicación en la reducción, anulación, inhibición y prevención de la dislipidemia, hipercolesterolemia y trigliceridemia posprandial en un individuo que lo necesite.

35

Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno antagonistas anti-PCSK9 de la presente tienen aplicación en la reducción o disminución del colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL-C) en un individuo que lo necesite. El individuo puede presentar de forma persistente niveles elevados de LDL-C. En algunas realizaciones, el individuo presenta unos niveles en plasma de LDL-C sistemáticamente por encima de 80 mg/dL, por ejemplo, por encima de 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 mg/dL o superiores. Los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno antagonistas anti-PCSK9 de la presente también tienen aplicación en la reducción o disminución del colesterol lipoproteico que no es de alta densidad (no-HDL-C) o el colesterol total en un individuo que lo necesite.

45

Puede ser que el individuo ya esté tomando otro agente farmacéutico para reducir el colesterol y que sea resistente o intolerante a ese agente. Por ejemplo, puede ser que el individuo ya esté siguiendo un régimen terapéutico con una estatina, el cual puede haber resultado ineficaz en este individuo a la hora de reducir LDL-C, no-HDL-C o el colesterol total hasta niveles aceptables. También puede ser que el individuo sea intolerante a la administración de una estatina. La administración combinada de los anticuerpos y moléculas de unión al antígeno antagonistas anti-PCSK9 de la presente con un segundo agente útil a la hora de reducir LDL-C o no-HDL-C y/o incrementar HDL-C mejorará la eficacia y tolerancia del segundo agente, por ejemplo, haciendo posible que se administren dosis más bajas del segundo agente.

50

En algunas realizaciones, el individuo presenta una mutación de ganancia de función en el gen PCSK9, por ejemplo, que da como resultado un incremento aberrante en la degradación de LDLR.

55

En algunas realizaciones, el individuo está recibiendo un agente farmacológico que induce dislipidemia o hipercolesterolemia, es decir, el individuo padece dislipidemia o hipercolesterolemia inducida por un fármaco. Por ejemplo, el individuo puede estar recibiendo un régimen terapéutico de inhibidores de proteasas, p. ej., para el tratamiento de una infección por VIH. Otro agente farmacológico conocido por provocar niveles elevados de triglicéridos en plasma es Tacrolimus, un fármaco inmunosupresor administrado para pacientes que reciben un trasplante. Se ha demostrado que la ciclosporina incrementa LDL de forma significativa. Remítase, p. ej., a Ballantyne

60

65

et al. (1996) 78(5):532-5. Los antipsicóticos de segunda generación (p. ej., aripiprazol, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona y ziprasidona) también se han asociado con la dislipidemia. Remítase, p. ej., a Henderson, *J Clin Psychiatry* (2008) 69(2):e04 y Brooks *et al.*, *Curr Psychiatry Rep* (2009) 11(1):33-40.

5 b. Administración de los anticuerpos anti-PCSK9

Un médico o veterinario puede comenzar con dosis de los anticuerpos de la invención que se emplean en la composición farmacéutica de niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar la dosis gradualmente hasta que se consiga el efecto deseado. En general, las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen la afección o enfermedad específica que se ha de tratar, los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, el hecho de que el paciente sea un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis del tratamiento deben ser tituladas para optimizar su seguridad y eficacia. Para la administración con un anticuerpo, la dosis varía en el intervalo de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0.01 a 5 mg/kg, de peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal, o pueden estar dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. La dosificación se puede llevar a cabo a diario, de forma semanal, cada dos semanas o una vez al mes, o más o menos a menudo, según sea necesario o según se desee. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3-6 meses.

En algunas realizaciones, se administra un polinucleótido que codifica un anticuerpo o molécula de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención. En las realizaciones en que el agente es un ácido nucleico, las dosis típicas pueden estar en el intervalo desde aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal hasta e incluidos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, p. ej., entre aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 mg/kg de peso corporal.

El anticuerpo se puede administrar en dosis individuales o divididas. El anticuerpo se administra habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser semanales, cada dos semanas, mensuales o anuales, según sea necesario o según se desee. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique al medir los niveles en sangre del anticuerpo anti-PCSK9 en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración del anticuerpo en plasma de 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de 25-300 µg/ml. Como alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados presentan una semivida más prolongada que la de los anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja con intervalos relativamente poco frecuentes durante un período de tiempo largo. Algunos pacientes siguen recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente elevada con intervalos relativamente cortos hasta que la evolución de la enfermedad se reduzca o termine, y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico. En algunas realizaciones, el anticuerpo o agente de unión al antígeno anti-PCSK9 se administra cuando los niveles en plasma de LDL-C en el paciente aumentan por encima de un nivel umbral predeterminado, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 mg/dL, por ejemplo, al menos aproximadamente 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 mg/dL o superior.

45 c. Coadministración con un segundo agente

El antagonista que es un anticuerpo contra PCSK9 se puede utilizar combinado con agentes conocidos por ser beneficiosos a la hora de reducir el colesterol, que incluye LDL-C, no-HDL-C y colesterol total, y/o aumentar HDL-C.

Los agentes activos se pueden administrar juntos en una mezcla con el anticuerpo antagonista anti-PCSK9 o se puede administrar cada agente por separado. El agente que es un anticuerpo y el otro agente activo se pueden administrar de forma concurrente, aunque no es necesario.

Los segundos agentes ilustrativos que se pueden utilizar en la coadministración con el anticuerpo o molécula de unión al antígeno antagonista anti-PCSK9 de la presente incluyen, sin carácter limitante, un inhibidor de la HMG-CoA-reductasa (es decir, una estatina), fibratos (p. ej., clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato), niacina y sus análogos, inhibidores de la absorción de colesterol, captadores de ácido biliar (p. ej., colestiramina, colestipol, colesvelam), un inhibidor del transporte ileal de ácido biliar (IBAT), un mimético de la hormona de la tiroides (p. ej., el compuesto KB2115), un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP), un agonista dual alfa y gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), un inhibidor de la acil-CoA:diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), un inhibidor de la acil-CoA:colesterol-aciltransferasa (ACAT), un inhibidor Niemann Pick C1-tipo 1 (NPC1-L1) (p. ej., ezetimiba), un agonista de las proteínas del casete de unión a ATP (ABC) G5 o G8, un inhibidor de las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), un ácido nucleico inhibidor que tenga PCSK9 como diana y un ácido nucleico inhibidor que tenga apoB100 como diana.

Otros agentes reductores de lípidos que se pueden utilizar se describen y/o revisan en, p. ej., Chang *et al.*, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop *et al.*, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays y Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda y Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum *et al.*, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh *et al.*, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch *et al.*, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; y Baxter y Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se coadministran con una estatina. Las estatinas ilustrativas incluyen, sin carácter limitante, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se coadministran con un agente farmacológico que induce hipercolesterolemia o trigliceridemia. Por ejemplo, el segundo agente farmacológico puede ser un inhibidor de proteasas, por ejemplo, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudina-zidovudina (Trizivir). En algunas realizaciones, el segundo agente farmacológico es Tacrolimus.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se coadministran con un ácido nucleico inhibidor (p. ej., un ARNip, un miARN, una secuencia antisentido, una ribozima) que tiene como diana específica PCSK9 o apoB100.

6. Kits

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden proporcionar en un kit. En ciertas realizaciones, un kit de la presente invención comprende un anticuerpo o molécula de unión al antígeno antagonista anti-PCSK9 de la invención, según se describe en la presente. Los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 se pueden proporcionar en dosis uniformes o variantes.

En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más de los segundos agentes farmacológicos, según se describe en la presente. El segundo agente farmacológico se puede proporcionar en la misma formulación o en formulaciones separadas de los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9. Las dosis de los primeros y segundos agentes pueden ser independientemente uniformes o variantes.

En algunas realizaciones, los kits comprenden el antagonista que es un anticuerpo contra PCSK9 y uno o más agentes conocidos por ser beneficiosos para reducir el colesterol, que incluye LDL-C, no-HDL-C y colesterol total, y/o aumentar HDL-C.

Los segundos agentes ilustrativos que se pueden incluir en los kits con el anticuerpo o molécula de unión al antígeno antagonista anti-PCSK9 de la presente incluyen, sin carácter limitante, un inhibidor de la HMG-CoA-reductasa (es decir, una estatina), fibratos (p. ej., clofibrato, gemfibrozilo, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato), niacina y sus análogos, inhibidores de la absorción de colesterol, captadores de ácido biliar (p. ej., colestiramina, colestipol, colesvelam), un inhibidor del transporte ileal de ácido biliar (IBAT), un mimético de la hormona de la tiroides (p. ej., el compuesto KB2115), un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP), un agonista dual alfa y gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), un inhibidor de la acil-CoA:diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), un inhibidor de la acil-CoA:colesterol-aciltransferasa (ACAT), un inhibidor Niemann Pick C1-tipo 1 (NPC1-L1) (p. ej., ezetimiba), un agonista de las proteínas del casete de unión a ATP (ABC) G5 o G8, un inhibidor de las proteínas de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), un ácido nucleico inhibidor que tenga PCSK9 como diana y un ácido nucleico inhibidor que tenga apoB100 como diana.

Otros agentes reductores de lípidos que se pueden utilizar en los kits se describen y/o revisan en, p. ej., Chang *et al.*, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop *et al.*, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays y Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda y Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum *et al.*, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh *et al.*, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch *et al.*, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; y Baxter y Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se proporcionan en los kits con una estatina. Las estatinas ilustrativas incluyen, sin carácter limitante, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o moléculas de unión al antígeno anti-PCSK9 de la invención se proporcionan en los kits con un agente farmacológico que induce hipercolesterolemia o trigliceridemia. Por ejemplo, el segundo agente farmacológico puede ser un inhibidor de proteasas, por ejemplo, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir,

Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudina-zidovudina (Trizivir). En algunas realizaciones, el segundo agente farmacológico es Tacrolimus.

Ejemplos

5

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Generación e identificación del antagonista contra Pcsk9 NVPLFU720

10 Compendio

Se llevaron a cabo estudios para generar un antagonista que fuera un anticuerpo funcional contra Pcsk9. Se identificaron múltiples hibridomas que secretaban un anticuerpo capaz de unirse a una versión de la proteína marcada con His. Se evaluaron los anticuerpos de los hibridomas para determinar su actividad antagonista funcional, que se midió según su capacidad para inhibir la degradación del receptor de LDL mediada por Pcsk9 en células HepG2, que da como resultado una mayor capacidad de estas células para captar colesterol LDL. Se identificó un anticuerpo monoclonal anti-IgG1-kappa de Pcsk9 humana de murino funcional potente y se denominó NVP-LFU720 (LFU720).

20 Métodos

Antígeno y otras proteínas

Se generó una línea celular de expresión estable que secretaba la proteína Pcsk9 humana mediante la transfección de células HEK293 Freestyle™ (Invitrogen, Carlsbad, Ca). En resumen, las células cultivadas en medio Freestyle™ (Invitrogen) más un 10% de suero bovino fetal en modo adherente en frascos BioCoat (Becton Dickinson) se transfectaron utilizando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000™ y un plásmido recombinante que contenía la secuencia señal de la melitina, el ADNc maduro de Pcsk9 (aa 31-692) y una marca de his6 (SEQ ID NO:57) en el extremo C-terminal de la secuencia (clonada por E.Hampton, GNF, NPL 010051). 48 horas después de la transfección, se inició la selección de los transfectantes positivos añadiendo 100 µg/mL de Zeocina en el medio de cultivo. Cuatro semanas después, emergieron cuatro agrupaciones de células estables de células productoras de Pcsk9. La agrupación 4, que fue la mayor productora, se adaptó a unas condiciones de suspensión exentas de suero en medio Freestyle™ y se escaló posteriormente para una producción a gran escala utilizando el biorreactor Wave™ en una escala de 10-20 L de volumen de producción.

Se produjeron varios lotes a lo largo del tiempo que proporcionaron la proteína recombinante producida con unas tasas comprendidas entre 12 y 30 mg/L. Los sobrenadantes celulares se cultivaron y concentraron mediante filtración de flujo cruzado. El concentrado resultante se aplicó a una columna de superflujo de 25 mL NiNTA His-Bind (equilibrada con Tris 50 mM/NaCl 300 mM/CaCl₂ 1 mM /β-Mercaptoetanol 2 mM, pH 7.4) a 0.5 mL/min. Después de lavar la línea de base con Tris 50 mM/NaCl 300 mM/Imidazol 20 mM, pH 7.4, el material unido se eluyó con Tris 50 mM/NaCl 300 mM/Imidazol 250 mM, pH 7.4. El eluato resultante se sometió a diálisis frente a PBS, pH 7.3, se filtró de forma estéril y se tomaron alícuotas de este. Se analizó una muestra mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaños para determinar la oligomerización. El cromatograma de HPLC obtenido de la proteína purificada muestra dos picos, representando el principal un 85%. El análisis de HPLC-ESI MS de la proteína de longitud completa revela una masa de 58176.0 Da, la cual concuerda con la masa esperada de melitina-hsPcsk9 aa31-692-His con todos los residuos de cisteína oxidados. Parte de la muestra está además N-glicosilada. La proteína contaminante de aproximadamente 13 kD de masa parece ser, muy probablemente, el prodominio libre de la proteína. Los homólogos correspondientes de Pcsk9 procedentes de ratón y mono cinomólogo se produjeron con estrategias de expresión transitoria a gran escala utilizando de nuevo células HEK293 Freestyle cultivadas en una suspensión exenta de suero en medio Freestyle. Los plásmidos recombinantes, ADNc de Pcsk9 de ratón que contenía una secuencia líder natural y una marca de his6 (SEQ ID NO:57) en el extremo C-terminal y Pcsk9 de cino que contenía una secuencia líder de CD33 y una marca de his6 C-terminal (SEQ ID NO:57), se transfectaron en células Freestyle utilizando polietilenimina como portador de ADN plasmídico con una relación de 1:3 (µg/mL:µg/mL de ADN:PEI). Los lotes de producción se realizaron a una escala de 10 litros en biorreactores Wave™; la purificación y la caracterización de la proteína se llevaron a cabo de forma análoga a los protocolos descritos anteriormente para la proteína Pcsk9 humana. Los rendimientos para la proteína Pcsk9 de ratón estuvieron comprendidos en el intervalo de 0.7 y 2.7 mg/L de cultivo, la Pcsk9 de cino se obtuvo con 3.1 mg/L.

Generación de hibridomas

Inmunización de ratones y producción de hibridomas

60

Se diluyó Pcsk9 purificada en un factor de 1:1 con adyuvante completo de Freund antes de inmunizar ratones transgénicos Bcl-2 (cepa C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 wehi). Los ratones se inmunizaron utilizando un procedimiento que requiere una inmunización repetitiva en múltiples sitios (RIMMS, por sus siglas en inglés). En resumen, se inyectaron 1-3 µg de antígeno a los ratones en 8 sitios específicos próximos a los nodos linfáticos periféricos (PLN, por sus siglas en inglés). Este procedimiento se repitió 6 veces durante un periodo de 12 días. El Día 12, se recogió una muestra de sangre y se analizó la titulación de anticuerpo en suero mediante ELISA. El Día 15, se retiraron PLN agrupados

65

procedentes de los ratones con una titulación elevada. Para recolectar los linfocitos, los PLN se lavaron dos veces con DMEM sin aditivos y a continuación se disociaron haciéndolos pasar a través de un tamiz de .22 micras (Falcon #352350). Los linfocitos resultantes se lavaron 2 veces adicionales antes de la fusión. Se mezclaron células de mieloma NSO/Bcl-2 con los linfocitos con una relación de 2.5 linfocitos por cada célula NSO. La mezcla de células se centrifugó y posteriormente se añadió 1 mL de PEG 1500 gota a gota al pellet de células durante 1 min. Después de 30 segundos, se añadió lentamente 1 mL de DMEM y, 1 min después, se añadieron 19 mL de DMEM durante 5 min. Las células fusionadas se pelletizaron, se volvieron a suspender con una densidad de 2×10^5 células/mL en medio HAT (DMEM + 20% de FBS, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HAT, 0.5x HFCS) y se sometieron a 37 °C durante 1 h. A continuación, las células se colocaron en placas de 384 pocillos en una cantidad de 60 μ L / pocillo.

Cribado de hibridomas que secretan anticuerpos funcionales para Pcsk9

Diez días después de la fusión, las placas de hibridomas se cribaron para determinar la presencia de anticuerpos específicos para Pcsk9. Para el cribado de ELISA, se recubrieron placas de 384 pocillos Maxisorp (Nunc #464718) con 50 μ L de Pcsk9 (diluida hasta 15 ng/pocillo en PBS) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. La proteína restante se aspiró y los pocillos se bloquearon con BSA al 1% en PBS. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS + 0.05% de Tween (PBST). Se transfirieron 15 μ L de sobrenadante de hibridoma a las placas de ELISA. Se diluyeron 15 μ L de suero de ratón, tomados en el momento de la retirada de PLN, en un factor de 1:1000 en PBS y se añadieron como un control positivo. Se añadieron 50 μ L de anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón - HRP producido en cabra (Jackson Immuno Research #115-035-071), diluido en un factor de 1:5000 en PBS) a todos los pocillos de las placas de ELISA. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 1 h, las placas se lavaron ocho veces con PBST. Se añadieron 25 μ L de TMB (KPL #50-76-05) y, después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente, se realizó la lectura de las placas a una absorbancia de 605 nm. Las células de los pocillos positivos se expandieron en placas de 24 pocillos en medio HT (DMEM + 20% de FBS, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HT, 0.5x HFCS).

Purificación del anticuerpo

El sobrenadante que contenía LFU720 se purificó utilizando proteína G (Upstate # 16-266 (Billerica, MA)). Antes de introducir el sobrenadante, la resina se equilibró con 10 volúmenes de columna de PBS. Tras la unión de la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y a continuación el anticuerpo se eluyó con 5 volúmenes de columna de glicina 0.1 M, pH 2.0. Las fracciones de la columna se neutralizaron inmediatamente con 1/10.^a parte de volumen de Tris HCl, pH 9.0. Se midió la DO280 de las fracciones, y las fracciones positivas se agruparon y sometieron a diálisis durante toda la noche frente a PBS, pH 7.2.

Cinética de unión y ensayo de Biacore

La determinación de los parámetros cinéticos de unión se realizó mediante mediciones de resonancia de plasmones superficiales utilizando el biosensor óptico Biacore S51. Esta tecnología hace posible la determinación sin marcadores de las constantes de velocidad microscópica para la unión (k_a) y la disociación (k_d) de un ligando a un receptor. Por consiguiente, es especialmente adecuada para caracterizar las interacciones de anticuerpo-antígeno.

Se llevaron a cabo estudios de unión de Pcsk9 a LFU720 (2 μ g/mL) capturando el anticuerpo de ratón con un anticuerpo anti-Fc γ de ratón producido en conejo (Biacore #BR-1005-14) que se había inmovilizado previamente sobre un chip sensor de la serie S CM-5 de Biacore (certificado) (Biacore #BR-1005-30). La unión covalente del anticuerpo de captura Fc γ se llevó a cabo con el «kit de acoplamiento de aminas» (Biacore #BR-1000-50). El anticuerpo de captura (anti-IgG de ratón producido en conejo) se unió a la superficie de dextrano activada con EDC con una solución de 50 μ g/mL de anticuerpo anti-Fc γ en acetato de sodio 10 mM, pH 5 (Biacore #BR-1003-51) con una tasa de flujo de 10 μ L/min. Se hicieron fluir una serie de concentraciones de Pcsk9 desde 0.5 μ M hasta 7.8 nM (dilución en serie de factor 2) sobre el chip de LFU720 capturado en PBS más NaCl 100 mM, 0.005% de P20 (Biacore #BR-1000-54). Los sensores resultantes se analizaron utilizando el software de evaluación Biacore S51. Los datos procedentes de todas las concentraciones se ajustaron globalmente a un modelo de Langmuir 1:1.

Ensayo de TR-FRET

El ensayo de TR-FRET se llevó a cabo en placas poco profundas blancas de 384 pocillos (Perkin Elmer, 6008280). Se incubó hPcsk9-AF (10.7 nM) con diluciones en serie de la proteína hPcsk9 no marcada, el péptido EGF-A o el anticuerpo NVP-LFU720-AX-1 durante 30 minutos a temperatura ambiente en 15 μ L de tampón de ensayo (HEPES 20 mM, pH 7.2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, 0.1% v/v de Tween 20 y 0.1% p/v de BSA). A continuación se añadieron 5 μ L de hLDL-R-Eu (4 nM) en tampón de ensayo al complejo preincubado de hPcsk9 y NVP-LFU720-AX-1 y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. Las concentraciones finales de estas proteínas marcadas fueron de 8 nM para hPcsk9-AF y 1 nM para hLDL-R-Eu. La señal de TR-FRET se midió con un lector de múltiples marcas EnVision 2100 (Perkin Elmer) a una excitación de 330 nm y una emisión de 665 nm. Los datos se convirtieron en valores normalizados utilizando la siguiente fórmula: $[(\text{valor de } 665 \text{ nm} \times 10\,000)/(\text{valor de } 615 \text{ nm})]$. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula: $100 - [(\text{valor normalizado de muestra tratada}/\text{valor normalizado promedio de muestras no tratadas}) \times 100]$. Las curvas de dosis-respuesta para el porcentaje de inhibición se

representaron en una gráfica utilizando Prism versión 5 con la fórmula $Y = \text{Mínimo} + (\text{Máximo} - \text{Mínimo}) / (1 + 10^{-(\text{Log}CI_{50} - X) \times \text{pendiente de Hill}})$ (software GraphPad Prism).

Ensayo de recambio de LDL-R

5 Se tripsinizaron células HepG2 y se sembraron con una densidad de 6×10^4 células por pocillo en 100 μL de medio de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, 3595) que se habían recubierto previamente con colágeno al 1% v/v), a continuación se incubaron a 37 °C en un 5% de CO_2 durante 24 horas. En general, las células se trataron con 100 μL de medio exento de suero que contenía o bien la proteína hPcsk9, el péptido EGF-A y/o el anticuerpo NVP-LFU720-AX-1. Después del tratamiento, el medio se descartó y las células se lavaron con 100 μL de PBS. Para recolectar las células, se añadieron 100 μL de Versine (Biowhitaker, 17-771E) y se incubaron durante una hora a 37 °C en un 5% de CO_2 , a continuación se añadieron 100 μL de tampón FACS. Las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en forma de V (Corning, 3894) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos para obtener pellets de las células. Para bloquear los sitios de unión no específica de las células, se añadieron 50 μL de IgG normal de conejo con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MP biomedical, 55944) e IgG de ratón (Sigma, I5381) en tampón FACS a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se eliminó el tampón girando la placa. Para marcar las células, se añadieron 10 μL de anticuerpo marcado de IgG de conejo anti-hLDL-R-Alexa 647 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 10 μL de anticuerpo marcado de IgG de ratón anti-transferrina-R-ficoeritrina (PE) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (CD71, Becton Dickinson Biosciences, 624048) en tampón FACS a cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos en hielo. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se eliminó el tampón girando la placa. Los anticuerpos no unidos se eliminaron lavando las células dos veces con 200 μL por pocillo de tampón FACS. Las células se fijaron en paraformaldehído al 1% en PBS, y las células viables se agruparon (5000) y analizaron utilizando un citómetro de flujo BD LSR II y el software FACSDIVA (Becton Dickinson). El valor mediano de fluorescencia de PE se midió a una excitación de 488 nm y una emisión de 575 nm. El valor mediano de fluorescencia de Alexa 647 se midió a una excitación de 488 nm y una emisión de 633 nm. Un anticuerpo anti-hLDL-R IgG 583 policlonal de conejo hecho a medida fue producido a medida por Covance (Denver, PA, EE. UU.) para la detección por FACS de hLDL-R superficial en células HepG2. El anticuerpo anti-hLDL-R IgG 583 de conejo exhibió una ventana con un factor de aproximadamente 7 para la detección de hLDL-R sobre la superficie de células HepG2 en comparación con IgG normal de conejo. Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-hLDL-R IgG 583 por LDL-R sobre la superficie de células HepG2, se llevó a cabo un experimento utilizando la proteína hLDL-R como un competidor para la unión de esta IgG. Se observó una reducción dependiente de la dosis en la fluorescencia del medio promedio para el anticuerpo anti-hLDL-R IgG 583 frente a las células HepG2 con concentraciones cada vez mayores de la proteína hLDL-R. Esto demostró que el anticuerpo anti-hLDL-R IgG 583 reconoce específicamente a LDL-R sobre la superficie de células HepG2, según se midió por FACS. Trabajos futuros utilizaron el anticuerpo de IgG anti-hLDL-R-583-Alexa 647 marcado directamente para la cuantificación por FACS de LDL-R sobre la superficie de células HepG2.

Captación de LDL-C

40 Se tripsinizaron células HepG2 y se sembraron con una densidad de 6×10^4 células por pocillo en 100 μL de medio de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, 3595, que se habían recubierto previamente con colágeno al 1% v/v), a continuación se incubaron a 37 °C en un 5% de CO_2 durante 24 horas. A menos que se especifique lo contrario, las células se trataron con 100 μL de medio exento de suero que contenía o bien la proteína hPcsk9, el péptido EGF-A y/o el anticuerpo NVP-LFU720-AX-1. Después del tratamiento, cada pocillo recibió 20 μL de lipoproteína de baja densidad marcada con 3,3'-dioctadecilindocarbocianina (DiI-LDL) (Intracell, RP-077-175) de concentración 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio exento de suero y se incubó a 37 °C en un 5% de CO_2 durante 2 horas. El medio se eliminó girando las placas y las células se lavaron con 100 μL de solución salina tamponada con fosfato (PBS sin calcio o magnesio, Invitrogen, 14190-144). El PBS se retiró girando las placas y se añadieron 100 μL de tripsina al 0.25% en EDTA a cada pocillo y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C en un 5% de CO_2 . Se añadieron 100 μL de tampón FACS (PBS que contenía un 5% de FBS, EDTA 2 mM y un 0.2% de azida sódica) a cada pocillo y se formaron pellets de las células mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos. El medio se descartó girando la placa y las células se fijaron mediante la adición de 50 μL de paraformaldehído al 1% (Electron Microscopy Sciences, 15710) en PBS por pocillo. Las células viables se agruparon y analizaron utilizando un citómetro de flujo BD LSR II y el software FACSDIVA (Becton Dickinson). El valor mediano de la fluorescencia de DiI-LDL se midió a una excitación de 488 nm y una emisión de 575 nm, y se analizaron 5000 células. Las gráficas de barras se generaron utilizando Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation). El porcentaje de activación se calculó como se indica a continuación: % de activación = $[1 - (X \div A)] \times 100$, donde X = lectura de fluorescencia del medio procedente del pocillo de la muestra y A = lectura de fluorescencia del medio procedente del pocillo con el tratamiento de hPcsk9 únicamente.

60 El porcentaje de activación se representó en una gráfica frente al tratamiento para determinar los valores de CE_{50} a partir de curvas de dosis-respuesta generadas utilizando la ecuación $Y = \text{Mínimo} + (\text{Máximo} - \text{Mínimo}) / (1 + 10^{-(\text{Log}CE_{50} - X) \times \text{pendiente de Hill}})$ y GraphPad Prism 5 (software de GraphPad).

Resultados

Generación de un anticuerpo monoclonal anti-Pcsk9 humana

5 Se recolectaron linfocitos B a partir de los nodos linfáticos primarios de animales inmunizados con la proteína Pcsk9. Se generó el hibridoma utilizando una fusión mediada por PEG estándar. La fusión resultante se evaluó mediante ELISA y los candidatos positivos de unión a Pcsk9 humana se identificaron y expandieron para generar sobrenadantes. Se identificaron múltiples clones positivos por ELISA que se sometieron a triaje posteriormente mediante ensayos funcionales. El clon que se identificó como candidato principal es LFU720. Además de nuestro candidato principal, LFU720, se identificaron otros múltiples clones que no consiguieron bloquear la interacción de Pcsk9 y LDLr (que se evaluó mediante FRET) pero que, cuando se unieron a Pcsk9, fueron capaces de bloquear la capacidad de Pcsk9 de mediar la degradación de LDLr (que se evaluó mediante la captación de LDLc), incluidos los clones 21D6, 5A4-C1 y 13F1. El clon 21D6 también mostró capacidad de bloquear la degradación de LDLr por parte de Pcsk9 *in vivo*.

15 **Cribado de LFU720 para determinar la unión específica a Pcsk9**

Se examinó la especificidad de LFU720 evaluando la unión en ELISA a una serie de proteínas diferentes. La unión de LFU720 a tres proteínas diferentes marcadas con HIS se comparó con la unión a Pcsk9-HIS. Esto demostró que la unión a Pcsk9 es específica y que el anticuerpo no se unía a la marca de HIS.

20 **Evaluación de LFU720 para la unión a Pcsk9 de cinomólogo**

Se determinó la unión de LFU720 al homólogo de cinomólogo de Pcsk9. Para este ensayo, se utilizaron los sobrenadantes procedentes de células que expresaban Pcsk9 marcada con HIS de cinomólogo junto con una placa de captura de Ni, con lo que se evitó la necesidad de purificar el material. La Psk9 humana se diluyó y también se capturó mediante su marca de HIS. LFU720 fue capaz de unirse a Pcsk9 tanto humana como de cinomólogo. 5P20 tampoco se unió a LDL-R humano ni Pcsk9 de ratón en ELISA.

30 **Cinética de unión de LFU720**

El anticuerpo LFU720 de ratón, que reconoce la proteína Pcsk9 humana, se analizó para determinar su afinidad de unión utilizando una técnica de biosensor óptico (Biacore). Se observó que LFU720 se une con una afinidad elevada a Pcsk9 humana recombinante con una afinidad subnanomolar (KD =200 pM).

35 **Cribado de LFU720 para bloquear la interacción Pcsk9/LDL-R**

Se utilizó un ensayo TR-FRET para determinar si el anticuerpo anti-hPcsk9 NVP-LFU720 podría alterar la interacción entre las proteínas marcadas hPcsk9-AF y hLDL-R-Eu. Se evaluó la proteína hPcsk9 no marcada o el péptido EGF-A para demostrar que el ensayo podría detectar la alteración de la señal TR-FRET generada por la interacción de las proteínas marcadas hLDL-R-Eu y hPcsk9-AF. Unas concentraciones cada vez mayores de hPcsk9 no marcada compitieron con hPcsk9-AF por la unión a hLDL-R-Eu, lo cual dio como resultado una reducción de la señal TR-FRET. El péptido EGF-A alteró la interacción entre hLDL-R-Eu y hPcsk9-AF con una CI₅₀ de 2.5 μM. Por el contrario, NVP-LFU720 alteró poco la señal TR-FRET entre hPcsk9-Eu y hLDL-R-AF con una CI₅₀ superior a 1000 nM, y exhibió una respuesta en forma de U para concentraciones bajas del anticuerpo.

45 **Cribado de LFU720 para inhibir la degradación de LDL-R mediada por Pcsk9**

Se ha demostrado que la unión de Pcsk9 a LDL-R conduce a la degradación de LDL-R y esto se confirmó utilizando células HepG2 y Pcsk9 humana recombinante. Se determinó la capacidad de LFU720 para unirse a Pcsk9 y bloquear su efecto. NVP-LFU720 inhibió células HepG2 tratadas con hPcsk9 exógena y condujo a un incremento de LDL-R en la superficie de las células.

50 **Cribado de LFU720 para inhibir Pcsk9 y restablecer la captación de LDL**

55 La inhibición de la degradación de LDL-R por parte de Pcsk9 debería restablecer la capacidad de las células HepG2 para interiorizar LDL-C. NVP-LFU720 evitó la degradación de LDL-R mediada por Pcsk9 en células HepG2 tratadas con hPcsk9 exógena y condujo a un incremento de la captación de Dil-LDL con una CE₅₀ de 99 nM.

60 **Ejemplo 2: Creación de los anticuerpos antagonistas de PCSK9 NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211**

Introducción

65 Este ejemplo describe la generación de los anticuerpos humanos NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 mediante la modificación genética del anticuerpo antagonista de PCSK9 monoclonal de murino NVP-LFU720 para que presente una mayor homología secuencial respecto a un anticuerpo de la línea germinal humana.. NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 conservan la especificidad del epítipo, afinidad y reactividad cruzada con PCSK9 de macaco

cinomólogo del anticuerpo de murino progenitor, NVP-LFU720. NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 presentan una homología mucho mayor respecto a la secuencia de la línea germinal humana que el anticuerpo de murino original y, por consiguiente, deberían ser mejor tolerados por el sistema inmunitario humano.

5 El anticuerpo monoclonal de ratón LFU720 se sometió a Humaneered™ para conseguir que su secuencia proteica fuera más similar a una secuencia de la línea germinal humana y se redujera su inmunogenicidad. Se puede acceder a la tecnología Humaneering™ mediante KaloBios de San Francisco del sur (en la página de Internet kalobios.com). Humaneering™ para anticuerpos genera anticuerpos humanos modificados genéticamente con secuencias de la región V que presentan una homología elevada respecto a una secuencia de la línea germinal humana a la vez que conservan la especificidad y afinidad del anticuerpo progenitor o de referencia (Publ. de Patente de EE. UU. 2005/0255552 y 2006/0134098). El proceso identifica en primer lugar los determinantes mínimos de la especificidad de unión al antígeno (BSD) en las regiones variables de la cadena ligera y pesada de un Fab de referencia (habitualmente secuencias dentro de la CDR3 de la cadena pesada y la CDR3 de la cadena ligera). Debido a que estos BSD de la cadena ligera y pesada se mantienen en todas las colecciones construidas durante el proceso Humaneering™, cada colección se centra en el epítipo y los anticuerpos completamente sometidos a Humaneered™ 15 finales conservan la especificidad del epítipo del anticuerpo de ratón original.

A continuación, se generan colecciones de cadenas completas (en las que una región variable entera de la cadena ligera o pesada se reemplaza con una colección de secuencias humanas) y/o colecciones de casetes (en las que una porción de la región variable de la cadena ligera o pesada del Fab de ratón se reemplaza con una colección de secuencias humanas). Se utiliza un sistema de secreción bacteriana para expresar los miembros de la colección como fragmentos Fab de anticuerpos y la colección se criba para determinar los Fab que se unen al antígeno utilizando un ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA, por sus siglas en inglés). Los clones positivos se caracterizan adicionalmente para identificar aquellos que presenten la afinidad más elevada. Los casetes humanos identificados que soportan la unión en el contexto de secuencias de murino residuales se combinan a continuación en un cribado final de la colección para generar regiones V completamente humanas. 20

Los Fab Humaneered™ resultantes tienen secuencias de segmento V derivadas de colecciones humanas, conservan las secuencias cortas de BSD identificadas dentro de las regiones CDR3 y tienen regiones de marco 4 de la línea germinal humana. Estos Fab se convierten en IgG completas clonando las regiones variables de las cadenas ligera y pesada en vectores de expresión de IgG. Los anticuerpos completamente sometidos a Humaneered™ generados en este proceso conservan la especificidad de unión del anticuerpo de murino progenitor, habitualmente presentan una afinidad equivalente o superior por el antígeno en comparación con el anticuerpo progenitor, y tienen regiones V con un elevado grado de identidad secuencial en comparación con los genes de los anticuerpos de la línea germinal humana a nivel proteico. 25

Métodos

Clonación de las regiones V de murino

40 El ADN de la región V de NVP-LFU720 monoclonal de murino se amplificó mediante RT-PCR a partir del ARN aislado de la línea de células de hibridoma utilizando métodos estándar. Los cebadores utilizados con éxito para la amplificación por PCR de la región variable de la cadena pesada del ADNc de hibridoma fueron V_H14 (5'-CTTCCTGATGGCAGTGGTT-3'; SEQ ID NO:58) (Chardes T *et al.* 1999, *FEBS Letters*; 452(3):386-94) y HCconstante (5'-GCGTCTAGAACTCCACACACAGRRCCAGTGGATAGAC-3'; SEQ ID NO:59). Los cebadores utilizados con éxito para la amplificación por PCR de la región variable de la cadena ligera (kappa) del ADNc de hibridoma fueron V_k4/5 (5'-TCAGCTTCYTGCTAATCAGTG-3'; SEQ ID NO:60) (Chardes T *et al.*, 1999, *supra*) y LCconstante (5'-GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG-3'; SEQ ID NO:61). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada amplificadas se secuenciaron. A continuación, se utilizó PCR para amplificar los genes V y para incorporar los sitios de enzimas de restricción para la clonación en vectores KaloBios: V_H en KB1292-His (versión modificada de KB1292 que codifica un conector flexible C-terminal y una marca de 6-His (SEQ ID NO:57) con la secuencia de aminoácidos AAGASHHHHHH (SEQ ID NO:62) en CH1 en *Nco*I (5') y *Nhe*I (3'); V_k en KB1296 en *Nco*I (5') y *Bs*WI (3'). A continuación, estos vectores de la cadena ligera y pesada separados se combinaron en un único vector de expresión Fab KaloBios dicistrónico mediante una digestión de restricción con *Bss*III y *Cla*I y ligación. Los fragmentos Fab se expresaron en *E. coli* a partir de este vector. Este Fab se evaluó para determinar su unión al antígeno PCSK9 y se hace referencia a él como Fab SR032 de referencia. 50

Purificación de Fab

60 Los fragmentos Fab se expresaron mediante secreción a partir de *E. coli* utilizando vectores de expresión KaloBios. Las células se cultivaron en medio 2xYT hasta obtener una DO600 de ~0.6. La expresión se indujo añadiendo IPTG hasta 100 µM y agitando durante 4 horas a 33 °C. Se obtuvo el Fab acoplado a partir de fracciones periplasmáticas mediante lisis osmótica y purificación por cromatografía de afinidad utilizando columnas de Ni-NTA (columnas HisTrap HP; n.º de catálogo de GE Healthcare 17-5247-01) de acuerdo con métodos estándar. Los Fab se eluyeron en tampón que contenía imidazol 500 mM y se sometieron a diálisis exhaustiva frente a PBS de pH 7.4 sin calcio ni magnesio. 65

Construcción de las colecciones

Para el primer paso en la construcción de las colecciones, se generaron colecciones de regiones V humanas completas centradas en el epítipo mediante amplificación por PCR de secuencias de colecciones de segmentos V humanos de KaloBios. Al preparar estas colecciones de cadena completa, las regiones únicas de CDR3-FR4 que contenían el BSD y secuencias de segmentos J de la línea germinal humana procedentes del Fab SR038 de referencia optimizado se unieron a las colecciones de segmentos V humanos utilizando PCR de solapamiento. Estas colecciones de regiones V completas no se cribaron directamente; en su lugar, se utilizaron como modelos para la construcción de las colecciones centrales de Vh y Vk. Se eligieron colecciones de segmentos V humanos de KaloBios utilizadas para la construcción de las colecciones de cadenas completas basándose en la secuencia de la línea germinal humana más parecida a las Vh y Vk de murino originales en las regiones de CDR. La Vh de NVP-LFU720 de murino original es la más parecida a la secuencia de la línea germinal humana de Vh1-02 en sus CDR, por lo tanto, se utilizó una mezcla de las dos colecciones de KaloBios que contiene los miembros del subgrupo Vh1 (KB1410 y KB1411) a la hora de preparar la colección de Vh completa. Del mismo modo, debido a que Vk de NVP-LFU720 es la más parecida a la secuencia de la línea germinal humana de Vk3 L6 en sus CDR, se utilizó una mezcla de las dos colecciones de segmentos V humanos de KaloBios que contienen los miembros del subgrupo Vk3 (KB1423 y KB1424) a la hora de preparar la colección de Vk completa. Estas colecciones de Vh y Vk de longitud completa se utilizaron a continuación como modelos para la construcción de colecciones de casetes, en las que se reemplaza únicamente parte del segmento V de murino progenitor por una colección de secuencias humanas. Se construyeron dos tipos de casetes mediante PCR de puente: los casetes de extremo frontal que contenían secuencias humanas en FR1, CDR1 y la primera parte de FR2 se amplificaron a partir de la mezcla de colecciones de Vh1 (KB1410 y KB1411) o la mezcla de colecciones de Vk3 (KB1423 y KB1424) que se han descrito anteriormente como modelo. Los casetes centrales que contenían secuencias humanas en la última parte de FR2, CDR2 y FR3 se amplificaron utilizando las colecciones de regiones Vh o Vk humanas completas que se han descrito anteriormente como modelos. Los casetes Vh presentaban secuencias comunes solapadas en FR2 en las posiciones aminoacídicas 45-49 (numeración de Kabat); los casetes Vk presentaban secuencias comunes solapadas en FR2 en los residuos aminoacídicos 35-39 (numeración de Kabat). De este modo, se construyeron colecciones de casetes humanos centrales y de extremo frontal mediante PCR para los isotipos V-h 1 y V-kappa 3. Cada colección de casetes Vh se clonó en el vector KB1292-His en *NcoI* (5') y *KpnI* (3'); cada colección de casetes Vk se clonó en el vector KB1296-B (versión modificada del vector KB1296 de KaloBios al cual se le ha añadido un sitio *HindIII* silenciado en FR4) en *NcoI* (5') y *HindIII* (3'). A continuación, las colecciones de plásmidos Vh o Vk resultantes se combinaron con la cadena complementaria del Fab SR038 de referencia optimizado (p. ej., la colección de extremos frontales de Vh se combinó con el vector Vk de referencia optimizado) mediante digestión con *BssHII* y *ClaI* y ligación posterior para crear colecciones de vectores dicistrónicos que expresan Fab completos.

ELISA general

Se utilizó el antígeno PCSK9-His6 de macaco cinomólogo o humano recombinante para todos los ensayos de ELISA. Habitualmente, el antígeno PCSK9-His6 diluido en PBS de pH 7.4 se unió a una placa de microtitulación de 96 pocillos con una concentración de 300 ng/pocillo mediante una incubación a 4 °C durante toda la noche. La placa se bloqueó con una solución al 3% de BSA en PBS durante una hora a 37 °C y a continuación se lavó una vez con PBST. A continuación, se añadió a cada pocillo medio de células inducidas que contenía Fab, o Fab purificado diluido (50 µL). Después de una incubación de una hora a 37 °C, la placa se lavó tres veces con PBST. Se añadió conjugado de anticadena kappa humana y HRP (Sigma #A7164) diluido con un factor de 1:5000 en PBS (50 µL) a cada pocillo y la placa se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con PBST, a continuación se añadieron 100 µL del sustrato SureBlue TMB (KPL #52-00-03) a cada pocillo y la placa se incubó durante ~10 min a temperatura ambiente. Se realizó una lectura de la placa a 650 nm en un espectrofotómetro.

Para los ELISA de especificidad en IgG de ratón y humanas purificadas, se recubrió una placa de 384 pocillos con un panel de antígenos de ratón o humanos purificados con una concentración de 88 ng por pocillo y se incubó durante toda la noche a 4 °C. La placa se bloqueó y lavó según se ha descrito anteriormente, a continuación se añadieron 22 µL de anticuerpo anti-PCSK9 humano o de ratón purificado diluido hasta 2 µg/mL en PBS a cada pocillo. La placa se incubó durante 1 h a 37 °C y a continuación se lavó con PBST. El anticuerpo anti-Fc de ratón (Jackson ImmunoResearch Labs #115-035-071) o anticuerpo anti-kappa humana (Sigma #A7164) conjugado con HRP se diluyó con un factor de 1:5000 en PBS (25 µL) y se añadió a cada pocillo. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se lavó y desarrolló según se ha descrito anteriormente.

Ensayo de unión de transferencia de colonias (CLBA)

Se llevó a cabo un cribado de las colecciones Humaneered™ de fragmentos Fab esencialmente según se describe en (las Publ. de Patente de EE. UU. 2005/0255552 y 2006/0134098) utilizando filtros de nitrocelulosa recubiertos con PCSK9-His6 de concentración 6 µg/mL. Los Fab unidos al filtro recubierto con antígeno se detectaron utilizando un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma #A3813) diluido con un factor de 1:5000 en PBST, y las inmunotransferencias se desarrollaron con un sustrato quimioluminiscente DuoLux para fosfatasa alcalina (Vector Laboratories #SK-6605).

Generación de PCSK9 recombinante biotinilada y medidas de afinidad

Se generó PCSK9 con marcas C-terminales de Avi (para la biotinilación dirigida al sitio) e His6 (SEQ ID NO:57) (PCSK9-Avi-His6) insertando un sitio de restricción EcoRI entre el gen que codifica PCSK9 y la marca de His6 (SEQ ID NO:57) en el plásmido pRS5a/PCSK9; expresa de aminoácidos 31-692 de PCSK9 de acceso a Uniprot Q8NBP7 con una marca de His6 C-terminal (SEQ ID NO:57). Los oligonucleótidos que codificaban la marca de Avi (secuencia de aminoácidos: GGGLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO:63) y flanqueados con protuberancias EcoRI se fosforilaron con polinucleótido-cinasa T4 (Invitrogen), se hibridaron y posteriormente se ligaron en pRS5a/PCSK9 utilizando el sitio EcoRI recién insertado. Los clones que contenían la marca de Avi se verificaron mediante análisis de secuencia. La expresión de PCSK9-Avi-His6 se llevó a cabo en el sistema de expresión 293 Freestyle (Invitrogen) y la proteína recombinante secretada se purificó utilizando una resina de Ni-NTA (QIAGEN). Tras la purificación, la proteína PCSK9-Avi-His6 se sometió a diálisis frente a Tris 10 mM de pH 8.0, NaCl 50 mM. La proteína se biotiniló *in vitro* con biotina-proteína-ligasa (Avidity) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de completarse, la reacción se sometió a diálisis frente a PBS de pH 7.2 y la biotinilación se verificó mediante transferencia de Western, utilizando como sonda estreptavidina conjugada con HRP.

Las cinéticas de unión de las IgG y los fragmentos Fab se analizaron utilizando un ensayo de titulación de equilibrio en solución («SET», por sus siglas en inglés). En resumen, se añadieron diluciones en serie de hPCSK9 a IgG o Fab 60 pM y se incubaron durante toda la noche. Se recubrió una placa de microtitulación Bind estándar de 96 pocillos (Meso Scale Discovery) con 1 µg/ml de hPCSK9 y se incubó durante toda la noche, se lavó con PBS/0.05% (p/v) de Tween 20, se bloqueó con PBS/5% (p/v) de BSA y se lavó de nuevo. El preparado de anticuerpo-antígeno se añadió a la placa Bind estándar recubierta con PCSK9 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado adicionales, se añadió el anticuerpo de detección anti-IgG humana producido en cabra marcado con Sulfo-Tag (R32AJ-5, Meso Scale Discovery) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa tres veces, se añadió tampón de lectura (Meso Scale Discovery) y se midieron las señales de electroquimioluminiscencia (ECL) con un generador de imágenes Sector 6000 (Meso Scale Discovery). Los datos de ECL se procesaron con excel add-in XLfit 4.3.2 (ID Business Solutions) utilizando el modelo de ajuste aplicable para anticuerpos descrito en Piehler *et al.*, (1997) *J Immunol Methods* 201:189-206. Se observó una unión de afinidad elevada entre PCSK9 humana y los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 en solución, con valores de KD de 150-190 pM calculados para cada uno.

Producción y purificación de los anticuerpos

Se produjeron los anticuerpos NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 completamente sometidos a Humaneered™ (IgG1 kappa silenciada) mediante la cotransfección de los vectores según se indica a continuación en células 293 Freestyle utilizando el reactivo de transfección 293fectin (Invitrogen #51-0031) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

LGT-209 - pJG04 (Vh) +pJG10 (Vk)

LGT-210 - pJG04 (Vh) + pJG01 (Vk)

LGT-211 - pSR74 (Vh) + pJG10 (Vk)

El anticuerpo se purificó a partir de los sobrenadantes de las células 293 Freestyle utilizando una columna HP de proteína A HiTrap de 5 mL (GE Healthcare #17-0403-03). El anticuerpo se eluyó utilizando tampón de elución de IgG (Pierce #21004) y se intercambió el tampón por PBS mediante diálisis. Se llevó a cabo una cromatografía de afinidad de proteína A en un sistema de cromatografía líquida AKTAFPLC (GE Healthcare).

Ensayo de competición por el epítipo

Se evaluó la competición entre el anticuerpo de ratón original NVP-LFU720 y su derivado Humaneered™ NVP-LGT209 por la unión al epítipo en PCSK9 utilizando el sistema Octet QK de ForteBio y biosensores de unión elevada de estreptavidina recubiertos con PCSK9-Avi-His6 biotinilada. A continuación, se unieron tres anticuerpos diferentes para separar los sensores recubiertos de PCSK9 hasta la saturación: LFU720 de ratón, LGT209 completamente humano o el anticuerpo de ratón de control 7D16 (del que existe constancia que contiene un epítipo diferente al de LFU720). A

continuación, todos los sensores se sumergieron en pocillos que contenían el anticuerpo de ratón LFU720 para determinar si el primer anticuerpo podría bloquear la unión de LFU720.

Resultados

5

Secuencias de aminoácidos de regiones V de referencia y de murino

Se secuenciaron productos de RT-PCR procedentes de células de hibridoma que expresan NVP-LFU720 y esta secuencia se verificó en gran medida (un 95% o más) a nivel proteico utilizando un espectrómetro de masas ThermoElectron LTQ-Orbitrap. A continuación, las regiones variables de la cadena ligera y pesada de LFU720 se clonaron en vectores de KaloBios con el fin de crear el Fab SR032 de referencia. El primer aminoácido en Vk de NVP-LFU720 se tuvo que cambiar de una glutamina (Q) a un ácido glutámico (E) para hacer posible su clonación en vectores de KaloBios para la generación del Fab SR032 de referencia; por consiguiente, Vk de SR032 tiene ácido glutámico en la primera posición de Vk. El Fab SR032 tiene regiones V de murino intactas de NVP-LFU720 fusionadas con regiones constantes humanas y se purificó a partir de *E. coli*. En una prueba ELISA de dilución de unión al antígeno PCSK9-His6, el Fab de referencia SR032 clonado produjo curvas de unión que eran dependientes de la concentración de Fab. Además del Fab de referencia (SR032), se construyó un Fab de referencia optimizado, SR038. Varios residuos aminoacídicos de marco en SR032 se cambiaron por línea germinal humana en SR038.

Análisis de afinidad de Fab de referencia y de referencia optimizado

Los residuos de la línea germinal humana incorporados en el Fab de referencia optimizado SR038 en FR1 y FR3 son los especificados por los cebadores de PCR utilizados para amplificar el repertorio de segmentos V humanos y, por lo tanto, están presentes en todos los miembros de las colecciones de regiones V de Humaneered™. El Fab de referencia optimizado se construye para evaluar si cualquiera de los cambios en la línea germinal humana alteran o no las propiedades de unión del Fab. Mediante ELISA de dilución utilizando Fab purificados, se determinó que las afinidades de SR032 y SR038 por el antígeno PCSK9 recombinante eran idénticas, lo cual indica que los cambios de aminoácidos en SR038 son tolerados.

Construcción de las colecciones y selección de los Fab completamente sometidos a Humaneered™

Se generaron colecciones de casetes centrales y de extremos frontales de la cadena ligera y pesada restringidas por el subgrupo a Vh1 o Vk3 y se cribaron mediante CLBA. Para Vh, se identificaron casetes de extremos frontales que soportaron la unión al antígeno PCSK9 mediante un ensayo de unión de transferencia de colonias, pero no se identificaron casetes centrales para Vh. Para Vk, se identificaron tanto casetes centrales como de extremos frontales mediante transferencia de colonias y, además, se identificaron algunos clones de Vk completos (debido a la contaminación de la colección de extremos frontales de Vk con clones de Vk de cadena completa). Muchos de los candidatos de unión de cada colección reconfirmados en un ensayo ELISA en sobrenadantes de células que contienen Fab, y varios Fab procedentes de cada colección se purificaron a partir de fracciones periplásmicas y se ordenaron según su categoría por afinidad utilizando un análisis Forte.

Debido a que no se identificaron casetes centrales para Vh que soportaran la unión a PCSK9, se construyeron dos colecciones mutagénicas que codificaban o bien el residuo de murino progenitor o el residuo más parecido de la línea germinal humana en todas las posiciones dentro de CDR2 o FR3 de la cadena pesada. De este modo, se construyó una colección de casetes centrales humanos modificados genéticamente, se cribó y se identificaron los clones de unión al antígeno. A continuación, los cambios en la línea germinal humana en el centro de Vh que soportaban la unión en el contexto de clones individuales se combinaron para crear un casete central final, y se confirmó que la afinidad de un Fab que contenía este casete en el contexto del Fab de referencia optimizado se unía, así como también el Fab de referencia optimizado mediante análisis Forte.

A partir de las colecciones creadas, se identificaron con éxito casetes humanos centrales y de extremos frontales que soportaban la unión al antígeno PCSK9 tanto para la cadena ligera como la pesada mediante CLBA. Estos candidatos de unión se confirmaron, todos ellos, mediante ELISA, a continuación se purificaron los Fab y se ordenaron según su categoría utilizando el sistema Octet de ForteBio. Los casetes de alta categoría para las cadenas ligera y pesada se combinaron en una colección final mediante PCR de puente y los Fab completamente sometidos a Humaneered™ que soportaban la unión a PCSK9 se seleccionaron a partir de esta colección mediante CLBA. En paralelo a todo esto, se combinaron conjuntamente todos los casetes o cadenas de mayor categoría (el mejor extremo frontal de Vh, el centro de Vh modificado genéticamente y la mejor cadena ligera completa) para crear un único Fab SR066, del cual se prevé que soporte una unión de alta afinidad.

Las secuencias de las regiones variables de la cadena ligera y pesada para el mAb de ratón progenitor NVP-LFU720 y los Ab Humaneered™ NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 se muestran en las Figuras 1-4, respectivamente.

Evaluación de la afinidad de los Fab completamente sometidos a Humaneered™ por el antígeno PCSK9 utilizando el análisis Octet de ForteBio

65

El Fab sometido a Humaneered™ SR066 y tres Fab extraídos de la colección combinatoria final (#1-2, #3-2 y #4-2) se expresaron y purificaron. A continuación, se compararon las cinéticas de unión de estos cuatro Fab humanos respecto a la cinética del Fab de referencia optimizado SR038 utilizando el sistema Octet de ForteBio (datos numéricos resumidos en la Tabla 1).

5

Tabla 1**Afinidad de Fab completamente sometidos a Humaneered™ por PCSK9**

Fab	k_a	k_d	K_D
SR038	1.39E3	5.12E-4	3.69E-7
SR066	3.25E3	1.08E-3	3.33E-7
#1-2	6.91E3	2.16E-3	3.13E-7
#3-2	5.92E3	1.46E-3	2.47E-7
#4-2	***	***	***

*** No se detectó suficiente unión del Fab #4-2 para generar datos cinéticos fiables.

10

La determinación de la concentración proteica para estos Fab fue difícil; en este sentido, los datos de la velocidad de disociación (k_d) son mucho más fiables que los datos de la velocidad de asociación (k_a) y K_D (únicamente las velocidades de disociación son independientes de la concentración). Al parecer los cuatro Fab Humaneered™ evaluados presentaron unas velocidades de disociación que eran de 3 a 4 veces «peores» (es decir, más rápidas) que las del Fab de referencia optimizado. Esta disminución de la afinidad fue provocada probablemente por los extremos frontales de la cadena pesada de estos clones, ya que al parecer todos los candidatos de unión Fab seleccionados a partir de la colección de casetes de extremos frontales de la cadena pesada original presentaban unas velocidades de disociación «peores» que las del Fab de referencia optimizado (no se muestran los datos). Ya que el extremo frontal de la cadena pesada contiene CDR1, los cambios realizados en esta CDR en los casetes de extremos frontales de Vh suponían una causa potencial para la menor afinidad de los Fab Humaneered™ finales. De los Fab completamente sometidos a Humaneered™, SR066 presentó la mejor velocidad de disociación (Tabla 1) y hay tres diferencias entre SR066 y la secuencia de referencia (de ratón) en la CDR1 de la cadena pesada. Para evaluar la idea de que los cambios realizados en CDRH1 eran los responsables de la disminución en la afinidad observada en todos nuestros Fab Humaneered™, se cambiaron simultáneamente dos residuos a la vez en CDRH1 de SR066 para que volvieran a coincidir con los residuos de murino originales, y estos Fab alterados se expresaron y purificaron para realizar un análisis cinético Forte.

15

20

25

Un Fab con dos cambios simultáneos en CDRH1 (SR079) (Tabla 2) mejoró significativamente la cinética de unión de SR066 (los datos numéricos se resumen en la Tabla 3). De hecho, al parecer el Fab SR079 presentó una velocidad de disociación equivalente a la del Fab de referencia optimizado (de ratón) Fab SR038.

30

Tabla 2**Secuencia de CDRH1 del Fab con CDRH1 variante SR079***

SR066 (humaneered)	TYYMN	SEQ ID NO:64
SR038 (de ratón)	DMYMS	SEQ ID NO:65
SR079 (humaneered)	TMYMS	SEQ ID NO:66

35

*Los residuos humanos (derivados de SR066) y no variantes están en negrita; los residuos de murino están en fuente normal.

Tabla 3

40

Afinidad del Fab SR079 por PCSK9

Fab	k_a	k_d	K_D
SR038	2.69E3	3.68E-4	1.37E-7
SR079	6.01E3	3.26E-4	5.42E-8

Los Fab Humaneered™ SR066, #1-2, #3-2 y #4-2 contenían una secuencia de aminoácidos «Asn-Gly» («NG») en CDRH2, la cual procedía del anticuerpo de ratón original. Existe constancia de que esta secuencia puede experimentar potencialmente una desamidación, la cual es una propiedad indeseable para la producción. Por consiguiente, a la vez que se intentaba mejorar la afinidad del Fab Humaneered™ SR066, se construyeron dos colecciones mutagénicas en el contexto de SR066, en las cuales se sustituía «N» o «G» por cada aminoácido posible excepto el aminoácido original (p. ej., en la «colección de eliminación de N», se sustituía «N» por cada aminoácido excepto «N»). A continuación, los sobrenadantes de las células que contenían Fab procedentes de esta colección se cribaron mediante ELISA para

45

identificar los clones que ya no tuvieran la secuencia «NG» pero que siguieran conservando el nivel de unión de SR066 (el cual es inferior al del Fab de referencia optimizado SR038). La «colección de eliminación de N» no proporcionó ningún Fab que se uniera con el mismo grado que SR066, pero la «colección de eliminación de G» proporcionó Fab con niveles suficientes de unión que presentaron una serie de sustituciones diferentes en la posición «G». De entre ellos, se seleccionaron los Fab que contenían los cambios de «NG» por «NE», «NA» y «NM» para llevar a cabo su purificación y análisis cinético. Se observó que tenían cinéticas similares a las del Fab progenitor SR066.

Modificación genética de la IgG humana 7472 para mejorar su afinidad

Modificación genética de Vk

Con el fin de crear una IgG completamente humana, la secuencia Vh de SR079 (versión modificada de SR066 que presenta una afinidad mejorada) hasta CDRH2 se amplificó y se unió a la secuencia de un clon de la «colección de eliminación de G» (que contenía «NE» en CDRH2) de CDRH2 a lo largo de la mayor parte de FR4 mediante PCR de puente. Esta secuencia de Vh se clonó en pRS5a-hlgG1 LALA + KpnI (vector de clonación de IgG1 silenciado que ha sido modificado para añadir un sitio KpnI en FR4 sin que afecte a la secuencia de aminoácidos de Vh) en NruI (5') y KpnI (3') para crear pSR074. La Vk (desde FR1 hasta parte de FR4) de SR066 se amplificó y clonó en pRS5a-hkappa en AgeI y BsiWI para crear pSR072. Estos vectores se verificaron mediante secuenciación y se cotransfectaron en células 293 Freestyle. Esta IgG (a la cual se hace referencia como «7472») se purificó a partir de medio celular que contenía el anticuerpo. Sorprendentemente, el anticuerpo 7472 presentó una velocidad de asociación significativamente más lenta que el anticuerpo de ratón progenitor LFU720 mediante análisis de Biacore (no se muestra). Al intercambiar cada cadena humana por la cadena de ratón progenitora complementaria, se determinó que este defecto en la velocidad de asociación era debido a un problema con la cadena ligera humana. Se realizaron alteraciones en la cadena ligera humana de pSR072 para restaurar la afinidad (Tabla 4): los primeros cuatro residuos de la cadena ligera se volvieron a convertir en la secuencia de ratón, y los residuos en la segunda mitad de CDR1 se volvieron a convertir en los de ratón. Esta cadena ligera se clonó en pRS5a-hkappa según se ha descrito anteriormente para generar pJG10 y pJG01, y se generó una IgG completa mediante la cotransfección de pSR074 (vector Hc) y pJG10 (vector Lc) o pJG01 (vector Lc). Conjuntamente, estos cambios restauraron parcialmente la afinidad del anticuerpo Humaneered™ según se determinó mediante Biacore.

Tabla 4

Cambios realizados en la cadena ligera de IgG 7472

Extremo N-terminal de LC (SEQ ID NO:)		LC CDR1 (SEQ ID NO:)	
7472	EIVM (67)	7472	RASQSVSSSHVA (68)
LFU720	QIVL (69)	LFU720	SASSSVS--YMH (70)
pJG10	QIVL (69)	pJG10	RASQSVS--YMH (71)

La Tabla 4 muestra alineaciones de porciones de las cadenas ligeras del anticuerpo humano 7472, el anticuerpo de ratón progenitor LFU720 y la cadena ligera codificada por pJG10. Esta porción es idéntica a la cadena ligera codificada por pJG01. Los vectores de cadena ligera se utilizaron para la expresión de los anticuerpos Humaneered™ finales NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT-211.

Maduración por afinidad de CDRH3

En paralelo con las alteraciones de la cadena ligera, se construyó una colección de Fab para madurar por afinidad la CDR3 de la cadena pesada de pSR074. En esta colección, los residuos de CDR3 se sustituyeron de forma individual con todos los demás aminoácidos, excepto el residuo original. Esta colección se cribó mediante CLBA, se verificaron los candidatos de unión mediante ELISA y los Fab resultantes se purificaron y evaluaron mediante interferometría de biocapa para determinar si presentaban una cinética de unión mejorada respecto al Fab humano progenitor.

Se identificó una sustitución en CDRH3 que mejoró la afinidad de forma significativa: un cambio de A por N (Tabla 5). Posteriormente, se realizó este cambio en el contexto del plásmido de expresión de IgG para la cadena pesada de pSR074. Este nuevo constructo se denominó pJG04. El anticuerpo Humaneered™ final NVP-LGT209 (LGT209) se generó mediante la cotransfección de pJG04 (Hc) y pJG10 y su purificación posterior. El anticuerpo Humaneered™ final NVP-LGT210 (LGT210) se generó mediante la cotransfección de pJG04 (Hc) y pJG01 y su purificación posterior. Este cambio no se introdujo en el anticuerpo NVP-LGT211 (LGT211).

Tabla 5

Cambio realizado en la CDR3 de la cadena pesada de IgG 7472

Secuencia de CDRH3		SEQ ID NO:
7472	CARSYYYYAMDY	72
LFU720	CARSYYYYAMDY	72
pJG04	CARSYYYYNMDY	73

La Tabla 5 muestra alineaciones de CDR3 de la cadena pesada para el anticuerpo humano 7472, el anticuerpo de ratón progenitor LFU720 y la cadena pesada codificada por pJG04 (vector de cadena pesada utilizado para la expresión de los anticuerpos Humaneered™ finales NVP-LGT209 y NVP-LGT210). La sustitución de A por N está subrayada.

Análisis de las cinéticas de unión de NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 utilizando el sistema de titulación de equilibrio en solución (SET)

Utilizando el ensayo de SET, se determinó que las afinidades de unión de los anticuerpos NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 a PCSK9 humana estaban comprendidas entre 150 y 190 pM según se indica en la Tabla 6. Esto sugiere una interacción de alta afinidad entre los anticuerpos y PCSK9 en solución .

Tabla 6

Anticuerpo	K _D [pM]
LGT209	190 ± 50
LGT210	150 ± 50
LGT211	190 ± 50

Análisis de especificidad por el antígeno de NVP-LGT209 mediante ELISA

Con el fin de evaluar si la especificidad por el antígeno del anticuerpo de ratón progenitor LFU720 se conservaba en las IgG Humaneered™ LGT209, LGT210 y LGT211, se evaluó la unión de los anticuerpos a un panel de antígenos humanos y de ratón (así como también PCSK9 humana) en un ensayo ELISA. Los resultados de este ensayo (Figuras 5A-C) muestran que LGT209, LGT210 y LGT211 conservan una especificidad elevada por PCSK9, similar a la del anticuerpo de murino LFU720.

Unión del anticuerpo a la proteína Pcsk9 humana y de macaco cinomólogo en ELISA

Se evaluó LGT209, LGT210 y LGT211 para determinar la unión específica a Pcsk9 humana y de macaco cinomólogo (cino). Este ensayo ELISA muestra que, al igual que el anticuerpo de ratón progenitor LFU720, los anticuerpos Humaneered™ LGT209, LGT210 y LGT211 son capaces de unirse a Pcsk9 tanto humana como de cino de forma similar (Figuras 6A-C).

Ensayo de competición por el epítipo basado en interferometría de biocapa

Con el fin de evaluar si la especificidad por el epítipo del anticuerpo de murino progenitor NVP-LFU720 se conservaba en los anticuerpos Humaneered™ finales LGT209, LGT210 y LGT211, se desarrolló un ensayo de competición utilizando el sistema Octet de ForteBio. Los anticuerpos Humaneered™ LGT209, LGT210 y LGT211 bloquean la unión del anticuerpo de ratón progenitor NVP-LFU720, lo cual indica que los anticuerpos Humaneered™ conservan la especificidad por el epítipo del anticuerpo de murino original. Se obtuvieron resultados similares cuando se cambió el orden de adición de los anticuerpos, es decir, uniéndose en primer lugar NVP-LFU720 y a continuación el anticuerpo Humaneered™.

Secuencia de aminoácidos de los anticuerpos Humaneered™ LGT209, LGT210 y LGT211 y porcentaje de identidad respecto a la secuencia de la línea germinal humana

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las IgG Humaneered™ finales LGT209, LGT210 y LGT211 se muestran en las Figuras 2-4, respectivamente; las CDR están subrayadas y en negrita. Las secuencias de nucleótidos se incluyen en la lista de secuencias.

El porcentaje de identidad respecto a las secuencias de la línea germinal humana para los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 se determinó alineando las secuencias de aminoácidos de Vh y Vk frente a una única secuencia de la línea germinal humana (Vh1 1-02 y Vk3 A27, respectivamente; Tabla 7). Los residuos en CDRH3 y CDRL3 se omitieron del cálculo para cada cadena.

Tabla 7

Porcentaje de identidad de los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 respecto a las secuencias de la línea germinal humana

Vh frente a Vh1 1-02	Vk frente a Vk3 A27
89%	91%

En las leyendas de las Figuras 8-14, se menciona información adicional referente a la caracterización funcional de los anticuerpos Humaneered™.

Ejemplo 3: Análisis mutacionales de los anticuerpos antagonistas de PCSK9 NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211

5 Se evaluaron las variantes de los anticuerpos antagonistas de PCSK9 NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 para determinar su capacidad de unión a PCSK9. Los resultados se resumen como se indica a continuación:

10 Respecto a la CDR1 de la cadena pesada, **TM**YMS (SEQ ID NO:66), únicamente los clones que contienen los residuos de ratón originales (en negrita) conservan la cinética de unión del Ab de ratón (según se determina mediante un análisis de interferometría de biocapa). Por consiguiente, estos residuos dentro de la CDR1 de la cadena pesada desempeñan una función en la unión.

15 Respecto a la CDR2 de la cadena pesada, **RIDPAN**EHTNYAQKFQG (SEQ ID NO:74), los residuos en negrita no se alteraron en los candidatos de unión de los anticuerpos extraídos de una colección que codificaba o bien el residuo original (de ratón) o el residuo correspondiente en la secuencia más parecida de la línea germinal humana en cada posición (que se cribó mediante ELISA). Por consiguiente, los residuos en negrita desempeñan una función en la unión. Las sustituciones conservativas son toleradas en la posición indicada por el residuo de Glu subrayado, por ejemplo, esta posición puede ser A, E o D, según se determina mediante ELISA y se confirma mediante interferometría de biocapa.

20 Respecto a la CDR3 de la cadena pesada, **S**Y**Y**Y(A/N)**MD**Y (SEQ ID NO:75), los residuos en negrita no se alteraron en los clones extraídos de una colección de maduración por afinidad que codificaba todas las posibilidades de aminoácidos (excepto el aa original) en cada posición. Por consiguiente, los residuos en negrita desempeñan una función en la unión. Las sustituciones conservativas son toleradas en la posición indicada por el residuo de Ala o Asn subrayado, por ejemplo, esta posición puede ser A, N o Q, según se determina mediante Biacore. Las sustituciones conservativas son toleradas en la posición indicada por el residuo de Tyr subrayado, por ejemplo, esta posición puede ser A, F, S, V o Y, según se determina mediante Biacore.

30 Respecto a la FR1 de la cadena ligera, (E/Q)IV(M/L)TQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:76), las sustituciones conservativas son toleradas en las posiciones subrayadas 1 y 4, según se determina mediante Biacore. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 1 puede ser A, D, E, N o Q. El aminoácido en la posición 4 puede ser V, I, L o M. Posiciones 1-4 como QIVL (SEQ ID NO:69) (igual que en Vk del progenitor de ratón LFU720, LGT209 y LGT211) presentan una unión mejorada respecto a posiciones 1-4 como EIVM (SEQ ID NO:67) (igual que en Vk de LGT210), según se determina mediante Biacore.

35 Respecto a la CDR1 de la cadena ligera, RASQSV**S**Y**M**H (SEQ ID NO:71), el espacio de los residuos en negrita tiene consecuencias para la unión, ya que un clon humano con 2 aminoácidos extra en esta porción de CDR1 de Lc presentó una afinidad comprometida. Por consiguiente, los residuos en negrita desempeñan una función en la unión.

40 Respecto a la CDR3 de la cadena ligera, **LQWSSDPPT** (SEQ ID NO:26), los cambios por la línea germinal humana en estas posiciones no son tolerados, según se determina mediante ELISA. Por consiguiente, los residuos en negrita desempeñan una función en la unión.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Rue, Sarah
 Cohen, Steve B.
 Yowe, David
 5 IRM LLC
 Novartis AG
- <120> Antagonistas de PCSK9
- 10 <130> PAT053967-WO-PCT
- <140> WO no asignado todavía
 <141> No asignado todavía
- 15 <150> US 61/285,942
 <151> 2009-12-11
- <160> 76
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
 <211> 118
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
- <220>
 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 de ratón LFU720
- 30 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Met
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Ala Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Lys Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115
- <210> 2
 35 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 40 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena pesada Vh del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG04 (clones LGT-209 y LGT-210)

ES 2 726 040 T3

<400> 2

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

5 <210> 3

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> cadena pesada Vh del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG04 (clones LGT-209 y LGT-210) que incluye la cadena constante de IgG1

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (235)...(236)

<223> Xaa = Ala o Leu

<400> 3

ES 2 726 040 T3

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

<210> 4

5 <211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena pesada Vh del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pSR74 (clon LGT-211)

<400> 4

ES 2 726 040 T3

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

<210> 5

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena pesada Vh del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pSR74
 (clon LGT-211) que incluye la cadena constante de IgG1

<220>

<221> VARIANTE

<222> (235)...(236)

15 <223> Xaa = Ala o Leu

<400> 5

ES 2 726 040 T3

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

<210> 6

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético de ratón LFU720

<400> 6

Asp Met Tyr Met Ser
 1 5

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

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena pesada de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9

<400> 7
 Thr Met Tyr Met Ser
 1 5

15 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena pesada consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Asp o Thr

30 <400> 8
 Xaa Met Tyr Met Ser
 1 5

35 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético de ratón LFU270

<400> 9
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Ala

45 <210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena pesada de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

5 <400> 10
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 11

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena pesada consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)...(7)

20 <223> Xaa = Ala, Glu o Gly

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)...(12)

25 <223> Xaa = Ala o Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)...(13)

30 <223> Xaa = Pro o Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (17)...(17)

35 <223> Xaa = Ala o Gly

<400> 11

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Xaa His Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Xaa

40 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada Vh del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG04 (clones LGT-209 y LGT-210)

50 <400> 12

Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr
 1 5

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

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada Vh del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 pSR74 (clon LGT-211) y del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético de ratón LFU270

10

<400> 13
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5

15

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ala o Asn

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Ala, Phe, Ser, Val o Tyr

35

<400> 14
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Xaa
 1 5

<210> 15
 <211> 106
 40 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 de ratón LFU720

45

<400> 15

ES 2 726 040 T3

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

<210> 16

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena ligera Vk del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG10 (clones LGT-209 y LGT-211)

<400> 16

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

15 <210> 17

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> cadena ligera Vk del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG10 (clones LGT-209 y LGT-211) que incluye la cadena constante kappa

<400> 17

ES 2 726 040 T3

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

<210> 18
 5 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena ligera Vk del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG01 (clon LGT-210)

<400> 18
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

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

20 <220>
 <223> cadena ligera Vk del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG01 (clon LGT-210) que incluye la cadena constante kappa

25 <400> 19

ES 2 726 040 T3

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

<210> 20

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético de ratón LFU720

<400> 20

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

15

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena ligera de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

25

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 22

30 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena ligera consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Arg o Ser

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Gln o Ser

15 <400> 22
 Xaa Ala Ser Xaa Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 23
 <211> 7

20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético de ratón LFU720

25 <400> 23
 Leu Thr Phe Asn Leu Ala Ser
 1 5

30 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) de la cadena ligera de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

40 <400> 24
 Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 7

45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) de la cadena ligera consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Gly o Leu
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = Thr o Val
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Asn o Arg
 15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)...(5)
 <223> Xaa = Leu o Arg
 20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Ser o Thr
 25

<400> 25
 Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Ala Xaa
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena
 ligera de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal
 anti-PCSK9 y del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético de ratón LFU720
 35

<400> 26
 Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
 1 5
 40

<210> 27
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45

<220>
 <223> segmento variable (FR1-FR3) de la cadena pesada de los clones LGT-209,
 LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético
 50

<400> 27

ES 2 726 040 T3

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

<210> 28

<211> 98

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> segmento variable (FR1-FR3) de la cadena pesada consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<220>

<221> VARIANTE

<222> (31)...(31)

15 <223> Xaa = Asp o Thr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (56)...(56)

20 <223> Xaa = Ala, Glu o Gly

<220>

<221> VARIANTE

<222> (61)...(61)

25 <223> Xaa = Ala o Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (62) ... (62)

30 <223> Xaa = Pro o Gln

<220>

<221> VARIANTE

<222> (66)...(66)

35 <223> Xaa = Ala o Gly

<400> 28

ES 2 726 040 T3

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

<210> 29

<211> 87

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> segmento variable (FR1-FR3) de la cadena ligera Vk del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG10 (clones LGT-209 y LGT-211)

<400> 29

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

15 <210> 30

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> segmento variable (FR1-FR3) de la cadena ligera Vk del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG01 (clon LGT-210)

<400> 30

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

25

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> segmento variable (FR1-FR3) de la cadena ligera Vk consenso del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG01 (clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211)

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (4)...(4)

<223> Xaa = Leu o Met

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (24)...(24)

<223> Xaa = Arg o Ser

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (27)...(27)

<223> Xaa = Gln o Ser

<220>

<221> VARIANTE

25 <222> (49)...(49)

<223> Xaa = Gly o Leu

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> (50)...(50)

<223> Xaa = Thr o Val

<220>

<221> VARIANTE

35 <222> (52)...(52)

<223> Xaa = Asn o Arg

<220>

<221> VARIANTE

40 <222> (53)...(53)

<223> Xaa = Leu o Arg

<220>

<221> VARIANTE

45 <222> (55)...(55)

<223> Xaa = Ser o Thr

<400> 31

ES 2 726 040 T3

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

<210> 32

<211> 30

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> región de marco 1 (FR1) de la cadena pesada de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<400> 32

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

15 <210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> región de marco 2 (FR2) de la cadena pesada de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<400> 33

25 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> región de marco 3 (FR3) de la cadena pesada de los clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<400> 34

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 35

40 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región de marco 4 (FR4) de la cadena pesada de los clones LGT-209, LGT-
 5 LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<400> 35
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

10 <210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> región de marco 1 (FR1) de la cadena ligera consenso de los clones LGT-
 209, LGT-210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Leu o Met

<400> 36
 Glx Ile Val Xaa Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 25 20

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región de marco 2 (FR2) de la cadena ligera de los clones LGT-209, LGT-
 210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

35 <400> 37
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 38
 40 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> región de marco 3 (FR3) de la cadena ligera de los clones LGT-209, LGT-
 210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

<400> 38

ES 2 726 040 T3

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

- 5 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> región de marco 4 (FR4) de la cadena ligera de los clones LGT-209, LGT-
 10 210 y LGT-211 del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético
- <400> 39
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10
- 15 <210> 40
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena pesada consenso del anticuerpo
 monoclonal anti-PCSK9 sintético
- <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Asp o Thr
- <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> (56)...(56)
 <223> Xaa = Ala, Glu o Gly
- <220>
 35 <221> VARIANTE
 <222> (61)...(61)
 <223> Xaa = Ala o Asp
- <220>
 40 <221> VARIANTE
 <222> (62)...(62)
 <223> Xaa = Pro o Gln
- <220>
 45 <221> VARIANTE
 <222> (66)...(66)
 <223> Xaa = Ala o Gly
- <220>
 50 <221> VARIANTE

<222> (104)...(104)
 <223> Xaa = Ala o Asn

<220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> (107)...(107)
 <223> Xaa = Ala, Phe, Ser, Val o Tyr

<400> 40
 10 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Xaa Met
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Xaa His Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe
 50 55 60
 Gln Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41
 <211> 106
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> región variable (FR1-FR4) de la cadena ligera consenso del anticuerpo
 20 monoclonal anti-PCSK9 sintético

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 25 <223> Xaa = Leu o Met

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)...(24)
 30 <223> Xaa = Arg o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (27)...(27)
 35 <223> Xaa = Gln o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49)...(49)
 40 <223> Xaa = Gly o Leu

<220>
 <221> VARIANTE

<222> (50)...(50)
 <223> Xaa = Thr o Val

<220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> (52)...(52)
 <223> Xaa = Asn o Arg

<220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (53)...(53)
 <223> Xaa = Leu o Arg

<220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> (55)...(55)
 <223> Xaa = Ser o Thr

<400> 41
 Glx Ile Val Xaa Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Xaa Ala Ser Xaa Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Ala Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 42
 <211> 354
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG04
 (clones LGT-209 y LGT-210)

30 <400> 42
 caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcagc actatgtata tgtcttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcgatcctg ccaatgagca cactaactat 180
 gcccaagaag tccaggggag ggtgactatg acaagggaca catccatcag cacagcctac 240
 atggagctca gcaggctgac gtctgacgac actgccgtct attactgtgc tagaagttac 300
 tattactata acatggacta ctgggggtcaa ggtaccctgg tgaccgtcag ctca 354

<210> 43
 35 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 726 040 T3

<223> cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pSR74 (clon LGT-211)

<400> 43

```

caggttcagc tggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcagc actatgtata tgtcttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggccttgagt gatgggaagg atcgatcctg ccaatgagca cactaactat 180
gccagaagt tccaggggag ggtgactatg acaagggaca catccatcag cacagcctac 240
atggagctca gcaggctgac gtctgacgac actgccgtct attactgtgc tagaagttac 300
5  tattactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggtaccctgg tgaccgtcag ctca 354
    
```

<210> 44

<211> 318

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG01 (clon LGT-210)

15

<400> 44

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc tatatgcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
caggctccca ggcctcctcat atatggtgtt ttcagaaggg cactggcat cccagacagg 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcggcagact ggagcctgaa 240
gattttgcag tgtactactg cctacagtgg agtagtgacc caccacgtt tggccaaggt 300
acgaagcttg aaattaa 318
    
```

20

<210> 45

<211> 318

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético pJG10 (clones LGT-209 y LGT-211)

<400> 45

```

cagattgttc tcaccagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc tatatgcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
caggctccca ggcctcctcat atatggtgtt ttcagaaggg cactggcat cccagacagg 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcggcagact ggagcctgaa 240
gattttgcag tgtactactg cctacagtgg agtagtgacc caccacgtt tggccaaggt 300
30 acgaagcttg aaattaa 318
    
```

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> epítipo del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 sintético

40

<400> 46

```

Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln
1           5           10
    
```

<210> 47
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9) humana, proproteína convertasa 9 (PC9), convertasa 1 regulada por apoptosis neural (NARC1, NARC-1), preproproteína LDLCQ1, FH3, HCHOLA3

10

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(30)
 <223> péptido señal

15

<220>
 <221> PROPÉP
 <222> (31)...(692)
 <223> proproteína

20

<220>
 <221> CADENA
 <222> (153)...(692)
 <223> proteína madura

25

<400> 47
 Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 -30 -25 -20 -15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
 -10 -5 1
 Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
 5 10 15

ES 2 726 040 T3

Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe
 20 25 30
 His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val
 35 40 45 50
 Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg
 55 60 65
 Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu
 70 75 80
 His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly
 85 90 95
 Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu
 100 105 110
 Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg
 115 120 125 130
 Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly
 135 140 145
 Gly Ser Leu Val Glu Val Tyr Leu Leu Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp
 150 155 160
 His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val Met Val Thr Asp Phe Glu Asn Val
 165 170 175
 Pro Glu Glu Asp Gly Thr Arg Phe His Arg Gln Ala Ser Lys Cys Asp
 180 185 190
 Ser His Gly Thr His Leu Ala Gly Val Val Ser Gly Arg Asp Ala Gly
 195 200 205 210
 Val Ala Lys Gly Ala Ser Met Arg Ser Leu Arg Val Leu Asn Cys Gln
 215 220 225
 Gly Lys Gly Thr Val Ser Gly Thr Leu Ile Gly Leu Glu Phe Ile Arg
 230 235 240
 Lys Ser Gln Leu Val Gln Pro Val Gly Pro Leu Val Val Leu Leu Pro
 245 250 255
 Leu Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Val Leu Asn Ala Ala Cys Gln Arg Leu
 260 265 270
 Ala Arg Ala Gly Val Val Leu Val Thr Ala Ala Gly Asn Phe Arg Asp
 275 280 285 290
 Asp Ala Cys Leu Tyr Ser Pro Ala Ser Ala Pro Glu Val Ile Thr Val
 295 300 305
 Gly Ala Thr Asn Ala Gln Asp Gln Pro Val Thr Leu Gly Thr Leu Gly
 310 315 320
 Thr Asn Phe Gly Arg Cys Val Asp Leu Phe Ala Pro Gly Glu Asp Ile
 325 330 335
 Ile Gly Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe Val Ser Gln Ser Gly
 340 345 350
 Thr Ser Gln Ala Ala Ala His Val Ala Gly Ile Ala Ala Met Met Leu
 355 360 365 370
 Ser Ala Glu Pro Glu Leu Thr Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ile
 375 380 385
 His Phe Ser Ala Lys Asp Val Ile Asn Glu Ala Trp Phe Pro Glu Asp
 390 395 400
 Gln Arg Val Leu Thr Pro Asn Leu Val Ala Ala Leu Pro Pro Ser Thr
 405 410 415
 His Gly Ala Gly Trp Gln Leu Phe Cys Arg Thr Val Trp Ser Ala His
 420 425 430
 Ser Gly Pro Thr Arg Met Ala Thr Ala Val Ala Arg Cys Ala Pro Asp
 435 440 445 450
 Glu Glu Leu Leu Ser Cys Ser Ser Phe Ser Arg Ser Gly Lys Arg Arg
 455 460 465
 Gly Glu Arg Met Glu Ala Gln Gly Gly Lys Leu Val Cys Arg Ala His
 470 475 480
 Asn Ala Phe Gly Gly Glu Gly Val Tyr Ala Ile Ala Arg Cys Cys Leu
 485 490 495
 Leu Pro Gln Ala Asn Cys Ser Val His Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ala
 500 505 510
 Ser Met Gly Thr Arg Val His Cys His Gln Gln Gly His Val Leu Thr
 515 520 525 530
 Gly Cys Ser Ser His Trp Glu Val Glu Asp Leu Gly Thr His Lys Pro

ES 2 726 040 T3

```

                    535                    540                    545
Pro Val Leu Arg Pro Arg Gly Gln Pro Asn Gln Cys Val Gly His Arg
                    550                    555                    560
Glu Ala Ser Ile His Ala Ser Cys Cys His Ala Pro Gly Leu Glu Cys
                    565                    570                    575
Lys Val Lys Glu His Gly Ile Pro Ala Pro Gln Glu Gln Val Thr Val
                    580                    585                    590
Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
595                    600                    605                    610
Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
                    615                    620                    625
Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val
                    630                    635                    640
Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
                    645                    650                    655
Gln Glu Leu Gln
                    660

```

- <210> 48
- <211> 3636
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (292) ... (2370)
- <223> proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9) humana, proproteína convertasa 9 (PC9), convertasa 1 regulada por apoptosis neural (NARC1, NARC-1), preproproteína LDLCQ1, FH3, HCHOLA3

- 15 <220>
- <221> péptido_señal
- <222> (292)...(381)
- <223> péptido señal

- 20 <220>
- <221> estructura_misc
- <222> (382)...(2367)
- <223> proproteína

- 25 <220>
- <221> péptido_maduro
- <222> (538) ... (2367)
- <223> proteína madura

- 30 <400> 48

ES 2 726 040 T3

cagcgacgtc gaggcgctca tggttgcagg cgggcgccgc cgttcagttc agggctctgag 60
cctggaggag tgagccaggc agtgagactg gctcggggcg gccgggacgc gtcgttcgag 120
cagcggtccc cagctcccag ccaggattcc gcgcgcccct tcacgcgccc tgctcctgaa 180
cttcagctcc tgacacgtcc tccccaccgc aaggctcaag gcgcgcggcg cgtggaccgc 240
gcacggcctc taggtctcct cgccaggaca gcaacctctc ccttggccct catgggcacc 300
gtcagctcca ggcggtcctg gtggccgctg ccactgctgc tgctgctgct gctgctcctg 360
ggtcccgcgg gcgcccgctg gcaggaggac gaggacggcg actacgagga gctggtgcta 420
gccttgctgt cagaggagga cggcctggcc gaagcaccgc agcacggaac cacagccacc 480
ttccaccgct gcgccaagga tccgtggagg ttgcctggca cctacgtggt ggtgctgaag 540
gaggagaccc acctctcgca gtcagagcgc actgcccgcc gcctgcaggc ccaggctgcc 600
cgccggggat acctaccaa gatcctgcat gtcttccatg gccttcttcc tggcttctg 660
gtgaagatga gtggcgacct gctggagctg gccttgaagt tgccccatgt cgactacatc 720
gaggagact cctctgtctt tgcccagagc atcccgtgga acctggagcg gattaccctt 780
ccaggtacc ggcgggatga ataccagccc cccgacggag gcagcctggt ggagggtgat 840
ctcctagaca ccagcataca gagtgaccac cgggaaatcg agggcaggtt catggtcacc 900
gacttcgaga atgtgcccgga ggaggacggg acccgcttcc acagacaggc cagcaagtgt 960
gacagtcatg gcaccacact ggcaggggtg gtcagcggcc gggatgccgg cgtggccaag 1020
ggtgccagca tgcgcagcct gcgcgtgctc aactgccaag ggaagggcac ggttagcggc 1080
accctcatag gcctggagtt tattcgaaa agccagctgg tccagcctgt ggggccactg 1140
gtggtgctgc tgccccatg ggggtgggtac agccgcgtcc tcaacgcccgc ctgccagcgc 1200
ctggcgaggg ctggggtcgt gctggtcacc gctgcgggca acttccggga cgatgcctgc 1260
ctctactccc cagcctcagc tcccagagtc atcacagttg gggccaccaaa tgcccraagc 1320
cagccggtga ccctggggag tttggggacc aactttggcc gctgtgtgga cctctttgcc 1380
ccaggggag acatcattgg tgccctcagc gactgcagca cctgctttgt gtcacagagt 1440
gggacatcac aggtgctgc ccacgtggct ggcattgcag ccatgatgct gtctgccgag 1500
ccggagctca ccctggccga gttgaggcag agactgatcc acttctctgc caaagatgtc 1560
atcaatgagg cctggttccc tgaggaccag cgggtactga cccccaacct ggtggccgcc 1620
ctgcccccca gcaccatgg ggcaggttgg cagctgtttt gcaggactgt atggtcagca 1680
cactcggggc ctacacggat ggccacagcc gtcgcccgtc gcgcccaga tgaggagctg 1740
ctgagctgct ccagtttctc caggagtggg aagcggcggg gcgagcgcag ggaggcccaa 1800
gggggcaagc tggctgccc ggcccacaac gcttttgggg gtgagggtgt ctacgccatt 1860
gccaggtgct gcctgctacc ccaggccaac tgcagcgtcc acacagctcc accagctgag 1920
gcccagatgg ggaccctgt ccactgccac caacagggcc acgtcctcac aggctgcagc 1980
tcccactggg aggtggagga ccttggcacc cacaagccgc ctgtgctgag gccacgaggt 2040
cagcccaacc agtgcggtgg ccacagggag gccagcatcc acgcttctg ctgccatgcc 2100
ccaggtctgg aatgcaaaagt caaggagcat ggaatcccgc cccctcagga gcaggtgacc 2160
gtggcctgcg aggagggctg gaccctgact ggctgcagtg ccctccctgg gacctcccac 2220
gtcctggggg cctacgcccgt agacaacacg tgtgtagtca ggagccggga cgtcagcact 2280
acaggcagca ccagcgaagg ggccgtgaca cccgttgcca tctgctgccg gagccggcac 2340
ctggcgcagg cctcccagga gctccagtga cagccccatc ccaggatggg tgtctgggga 2400
gggtcaaggg ctggggctga gctttaaaat ggttccgact tgtccctctc tcagccctcc 2460
atggcctggc acgaggggat ggggatgctt ccgcctttcc ggggctgctg gcctggccct 2520
tgagtggggc agcctccttg cctggaactc actcactctg ggtgcctcct cccaggtgg 2580
aggtgccagg aagctccctc cctcactgtg gggcatttca ccattcaaac aggtcgagct 2640
gtgctcgggt gctgccagct gctcccactg tgccgatgtc cgtgggcaga atgactttta 2700
ttgagctctt gttccgtgcc aggcattcaa tccctcaggtc tccaccaagg aggcaggatt 2760
cttcccatgg ataggggag ggccggtagg ggctgcaggg acaaacatcg ttggggggtg 2820
agtgtaaaag gctgtgatgg ccctcatctc cagctaactg tggagaagcc cctgggggct 2880
ccctgattaa tggaggctta gctttctgga tggcatctag ccagaggctg gagacagggtg 2940
cgcccctggt ggtcacaggc tgtgccttgg tttcctgagc cacctttact ctgctctatg 3000
ccaggctgtg ctagcaaacac ccaaaggtgg cctgcgggga gccatcacct aggactgact 3060
cggcagtgct cagtggtgca tgcactgtct gacccaacc gctccactac cggcagggt 3120
acacattcgc acccctactt cacagaggaa gaaacctgga accagagggg gcgtgcctgc 3180
caagctcaca cagcaggaac tgagccagaa acgcagattg ggctggctct gaagccaagc 3240
ctcttcttac ttcacccggc tgggctcctc atttttacgg gtaacagtga ggctgggaag 3300
gggaacacag accaggaagc tcgggtgagtg atggcagaac gatgcctgca ggcatggaac 3360
ttttccggtt atcaccagc cctgattcac tggcctggcg gagatgcttc taaggcatgg 3420
tcgggggaga gggccaacaa ctgtccctcc ttgagcacca gccccacca agcaagcaga 3480
catttatctt ttgggtctgt cctctctgtt gcctttttac agccaacttt tctagacctg 3540
ttttgctttt gtaacttgaa gatatttatt ctgggttttg tagcattttt attaatgatg 3600
tgacttttta aaataaaaac aaacaaactg tgtcct 3636

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> residuos 680-692 del epítipo del extremo C-terminal del anticuerpo anti-PCSK9 sintético

<400> 49

Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln
5 1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia parcial JH4 de la línea germinal humana sintética en el segmento J de la cadena pesada del anticuerpo anti-PCSK9

15

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 51

20 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> segmento J sintético de longitud completa de JH4 de la línea germinal humana

<400> 51

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

30

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> secuencia parcial Jk2 de la línea germinal humana sintética en el segmento J de la cadena ligera del anticuerpo anti-PCSK9

40

<400> 52

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 53

<211> 12

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> segmento J sintético de longitud completa de Jk2 de la línea germinal humana

<400> 53
 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 54
 5 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 10 <223> región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 de ratón LFU270

<400> 54
 gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttatgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag cttctggctt caacatcaaa gacatgtata tgagctgggt gaggcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg atcgatcctg cgaatggtca tactaactat 180
 gaccogaagt tccaggccaa ggccactata acaacagaca catcctccaa aacagcctac 240
 ctgcactca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaagttac 300
 15 tattactatg ctatggacta ctggggctcaa ggaacctcag tcaccgtctc ttca 354

<210> 55
 <211> 318
 <212> ADN
 20 <213> Mus musculus

<220>
 <223> región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 de ratón LFU270

25 <400> 55
 caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtgaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctcccca gactctggat ttatttaaca ttcaacttgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctctcaa tcagcagcat ggaggctgaa 240
 gatgtgcca ctattactg tctacagtgg agtagtgacc caccacgtt cggctcgggg 300
 acaaagttgg aaataaaa 318

<210> 56
 30 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> mutante C-terminal contra PCSK9 sintético A685X

<400> 56
 Arg Ser Arg His Leu
 1 5

40 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> marca de his6, marca de 6-His, marca de HIS C-terminal sintética

<400> 57
 His His His His His His
 1 5

5 <210> 58
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador sintético de amplificación por RT-PCR V-H14 para la región variable de la cadena pesada

15 <400> 58
 cttcctgatg gcagtggtt 19

20 <210> 59
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador sintético de amplificación por RT-PCR HCconstante para la región variable de la cadena pesada

<400> 59
 gcgtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac 39

30 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador sintético de amplificación por RT-PCR Vkappa4/5 para la región variable de la cadena ligera

40 <400> 60
 tcagcttct gctaatacgt g 21

45 <210> 61
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador sintético de amplificación por RT-PCR LCconstante para la región variable de la cadena ligera

<400> 61
 gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg 29

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> conector flexible C-terminal sintético y marca de 6-His

 10 <400> 62
 Ala Ala Gly Ala Ser His His His His His His
 1 5 10

 <210> 63
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> marca sintética de Avi para la biotinylación dirigida al sitio
 20
 <400> 63
 Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1 5 10 15
 Glu

 <210> 64
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> CDRH1 sintética de SR066 (humaneered)

 <400> 64
 Thr Tyr Tyr Met Asn
 1 5
 35
 <210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> CDRH1 sintética de SR038 (de ratón)

 <400> 65
 Asp Met Tyr Met Ser
 45 1 5

 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDRH1 sintética de SR079 (humaneered)

<400> 66
 Thr Met Tyr Met Ser
 5 1 5

<210> 67
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> extremo N-terminal sintético de la cadena ligera (LC) de 7472

15 <400> 67
 Glu Ile Val Met
 1

<210> 68
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR1 sintética de la cadena ligera (LC) de 7472

25 <400> 68
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Val Ala
 1 5 10

<210> 69
 30 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> extremo N-terminal sintético de la cadena ligera (LC) de LFU720 y pJG10

<400> 69
 Gln Ile Val Leu
 1

40 <210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) sintética de la
 cadena ligera (LC) de LFU720

<400> 70
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 50 1 5 10

<210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) sintética de la
 cadena ligera (LC) de pJG10
 10
 <400> 71
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

 <210> 72
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> CDR3 sintética de la cadena pesada (CDRH3) de 7472 y LFU720

 <400> 72
 Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 25 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> CDR3 sintética de la cadena pesada (CDRH3) de pJG04

 <400> 73
 Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr
 1 5 10
 35
 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> CDR2 sintética de la cadena pesada anti-PCSK9

 <400> 74
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 45 Gly

 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 sintética de la cadena pesada anti-PCSK9

 5 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ala o Asn

 <400> 75
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Tyr
 10 1 5

 <210> 76
 <211> 23
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> FR1 sintética de la cadena ligera anti-PCSK9

 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Met o Leu

 25 <400> 76

 Glx Ile Val Xaa Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une a la proproteína convertasa subtilisina/kexina de tipo 9 (PCSK9), donde el anticuerpo comprende:
- 5 una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden cada una las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; donde:
- 10 i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; y vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, o donde:
- 15 i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13; iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; y vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde:
- 25 i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6; ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20; v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde:
- 35 i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12; iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde:
- 40 i) la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; ii) la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10; iii) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; iv) la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; v) la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24; vi) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26.
- 45
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:1 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:15.
- 50
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:2 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:16.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:2 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:18.
- 55
8. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:4 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:16.
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:3 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:17.
- 60
10. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:3 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:19.
- 65

11. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO:5 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO:17.
- 5 12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el anticuerpo es un fragmento FAb', o donde el anticuerpo es una IgG, o donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única, o donde el anticuerpo comprende regiones constantes humanas, o donde el anticuerpo está unido a una proteína portadora, o donde el anticuerpo está PEGilado o donde el anticuerpo está humanizado.
- 10 13. Una composición que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 y un excipiente fisiológicamente compatible.
14. La composición de la reivindicación 13, donde la composición comprende además un segundo agente que reduce los niveles de colesterol lipoproteico de baja densidad (LDL-C) en un individuo.
- 15 15. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso en un método de reducción de LDL-C en un individuo que lo necesite.
- 20 16. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el individuo presenta un grado de respuesta anormalmente bajo a la terapia de estatinas o es resistente a esta, o donde el individuo es intolerante a la terapia de estatinas, o donde el individuo presenta un nivel de LDL-C de referencia de al menos aproximadamente 100 mg/dL, o donde el individuo padece hipercolesterolemia familiar, o donde el colesterol total se reduce con LDL-C, o donde el individuo parece trigliceridemia, o donde el individuo presenta una mutación en el gen PCSK9 de ganancia de función o donde el individuo padece dislipidemia inducida por fármacos.
- 25 17. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, donde dicho anticuerpo es para la administración con una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo agente eficaz a la hora de reducir LDL-C en el individuo.
- 30 18. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 16 o la composición de acuerdo con la reivindicación 14, donde el segundo agente es una estatina, preferentemente donde la estatina se selecciona del grupo constituido por atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina, o donde el segundo agente se selecciona del grupo constituido por fibratos, niacina y sus análogos, inhibidores de la absorción de colesterol, captadores de ácido biliar, miméticos de la hormona de la tiroides, un inhibidor de la proteína de transferencia de triglicéridos microsomal (MTP), un inhibidor de la diacilglicerol-aciltransferasa (DGAT), un ácido nucleico inhibidor que tenga PCSK9 como diana y un ácido nucleico inhibidor que tenga apoB100 como diana.

Figura 1

Secuencias de las regiones variables del mAb de ratón progenitor LFU720

Región variable de la cadena pesada de LFU720

EVQLQQSGAELMKPGASVKLSCTASGFNIKDMYMSWVRQRPEQGLEWIGRIDPAN
GHTNYDPKFQAKATITTTDTSSKTAYLHLSSLTSEDTAVYYCARSYYYAMDYWGQ
GTSVTVSS

Región variable de la cadena ligera (kappa) de LFU720

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMHWYQQKPGSSPRLWIYLTFNLA
SGVPARFSGSGSGTSYSLSSISMEAEADAATYYCLOWSSDPPTFGSGTKLEIK

Figura 2

Secuencias de las regiones variables del Ab NVP-LGT209

pJG04 (Vh) +pJG10 (Vk)

Vh de pJG04

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRRIDPA
NEHTNYAOKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARSSYYYYNMDYW
GQGTLVTVSS

Vk de pJG10

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLQWSSDPPTFGQGTKLEIK

Figura 3

Secuencias de las regiones variables del Ab NVP-LGT210

pJG04 (Vh) +pJG01 (Vk)

Vh de pJG04

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGGRIDPA
NEHTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARSSYYYYNMDYW
GGTLVTVSS

Vk de pJG01

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASOSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATG
IPDRFSGSGSGTDFLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

Figura 4

Secuencias de las regiones variables del Ab NVP-LGT211

pSR74 (Vh) +pJG10 (Vk)

Vh de pSR074

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGGRIDPA
NEHTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARSSYYYAMDYW
GQGLVTVSS

Vk de pJG10

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASOSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFERRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

Figura 5A

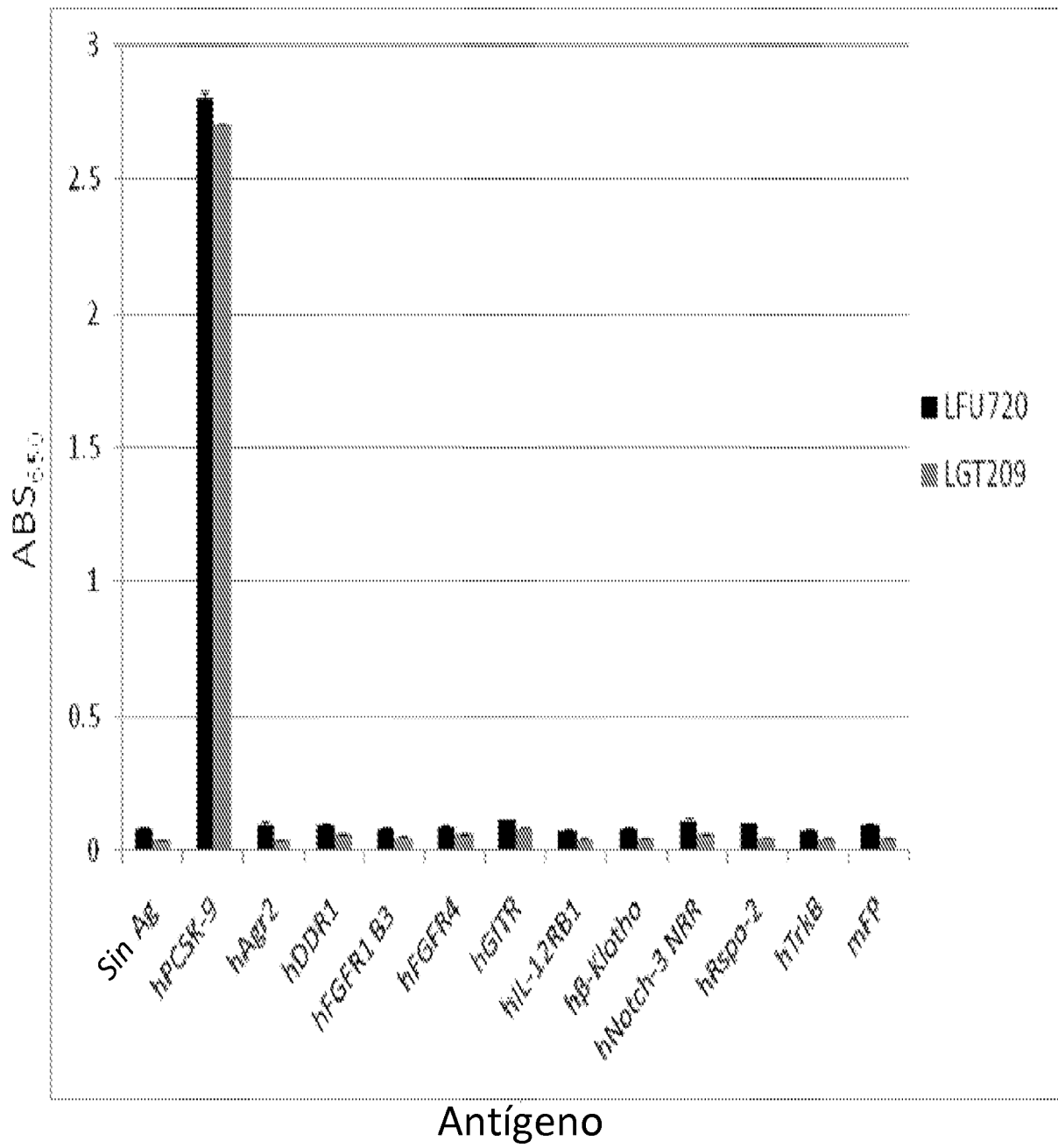


Figura 5B

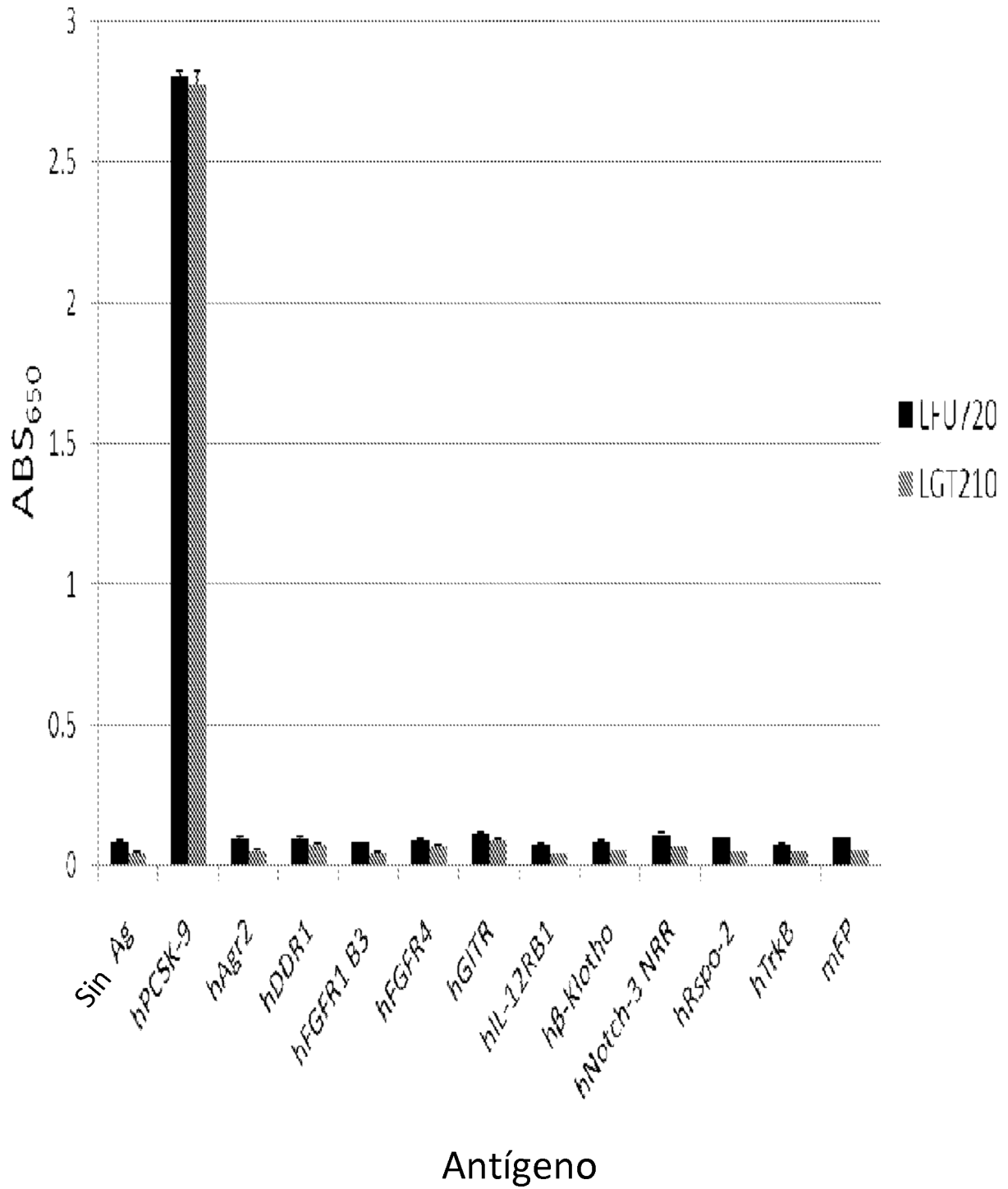


Figura 5C

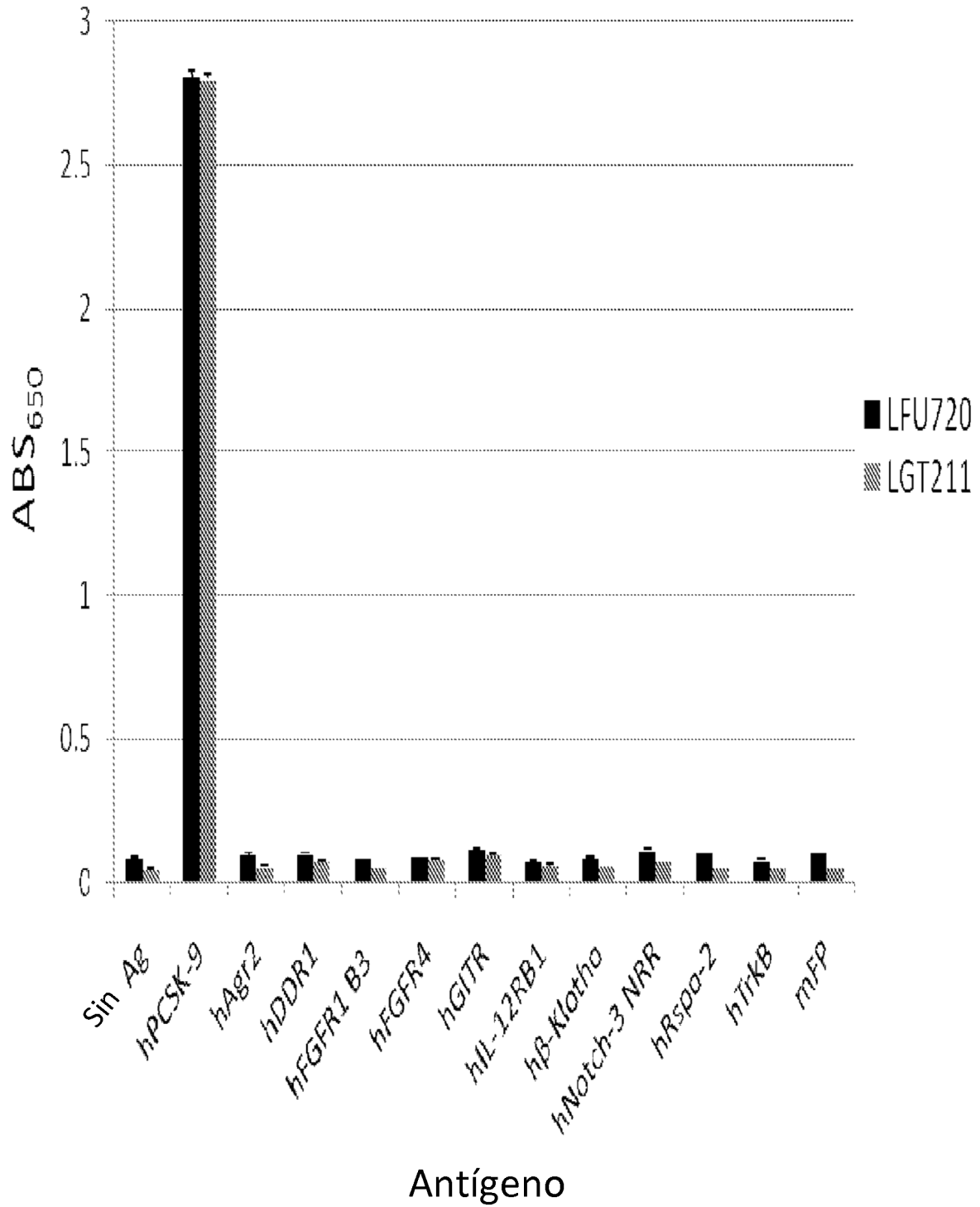


Figura 6A

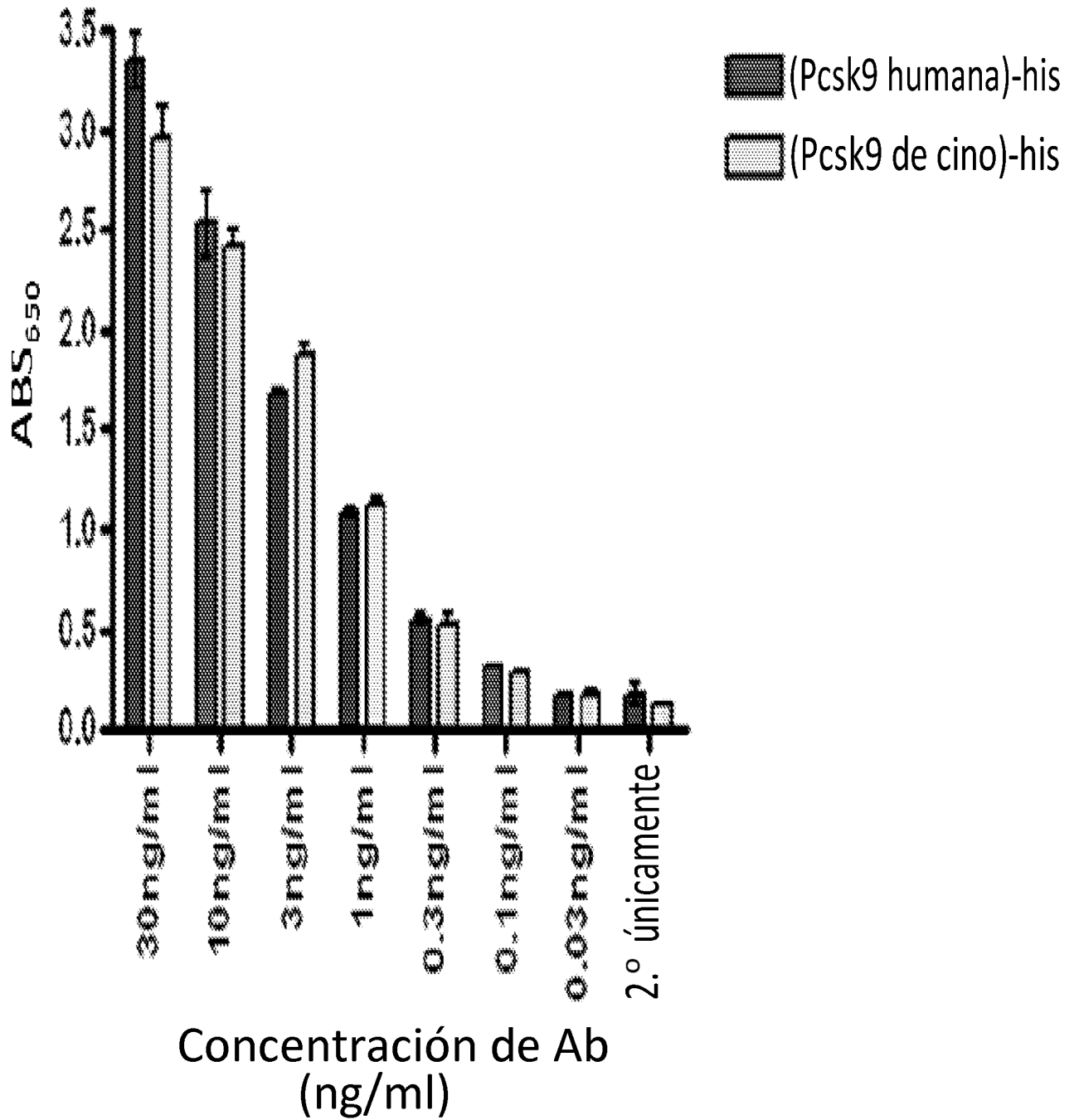


Figura 6B

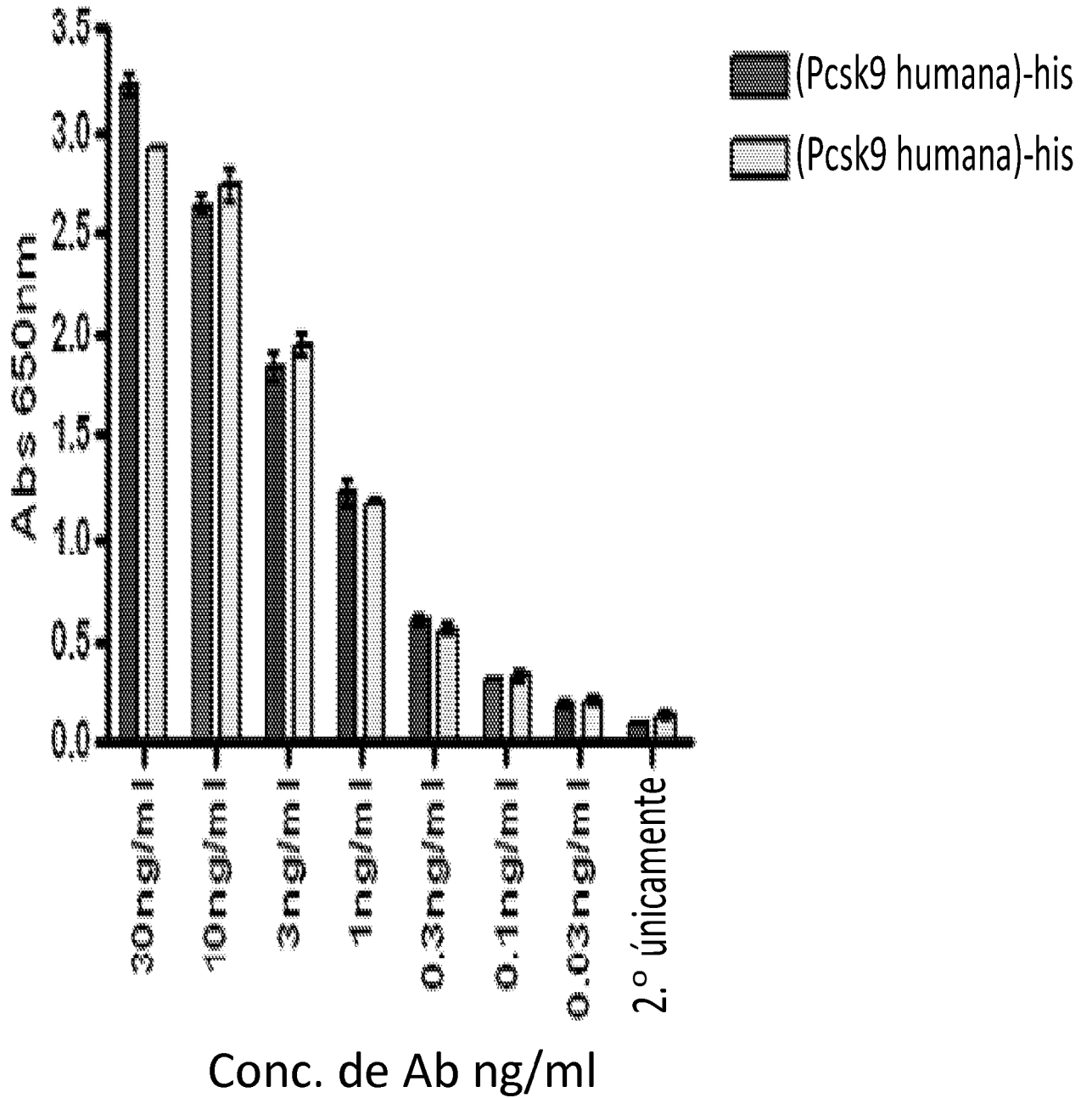


Figura 6C

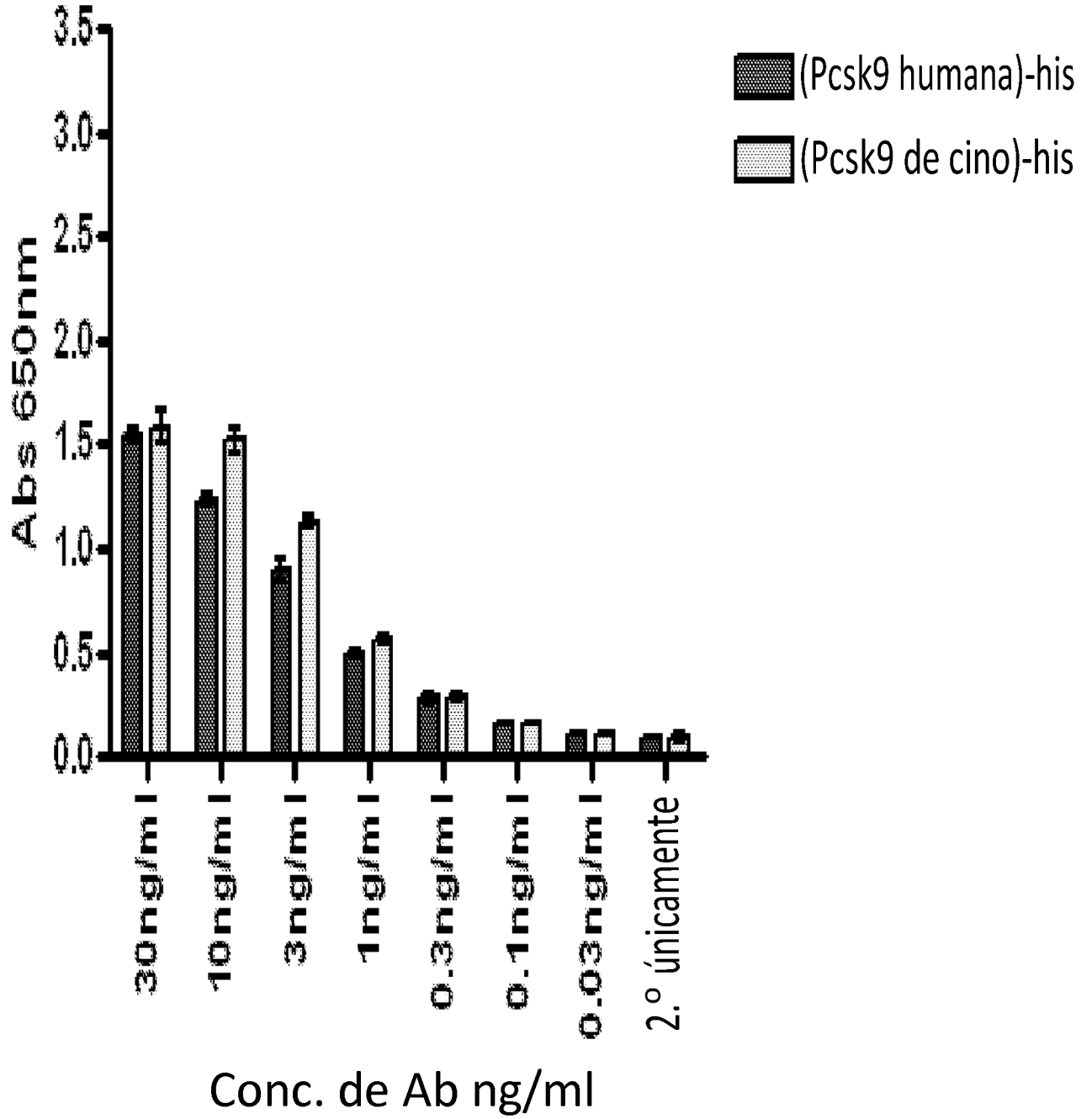


Figura 8

5P20 (no altera la FRET)

13C10 (altera la FRET)

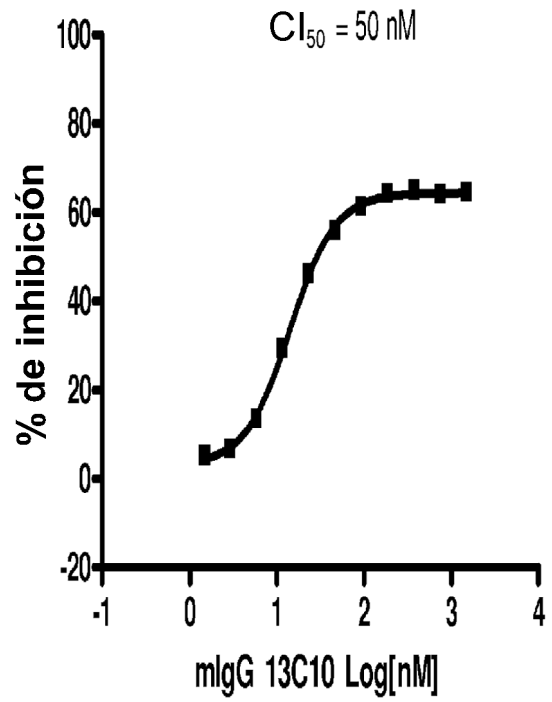
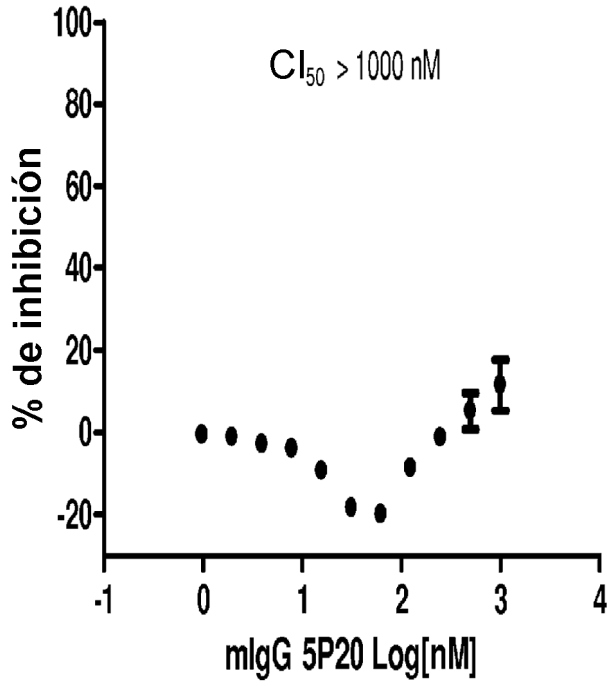


Figura 9

Anticuerpo	Elevación de LDL-R	Captación de LDL
LGT209	480 ± 64	255 ± 25
LGT210	480 ± 48	259 ± 22
LGT211	430 ± 60	230 ± 17
NVP-LFU720	520 ± 28	294 ± 62

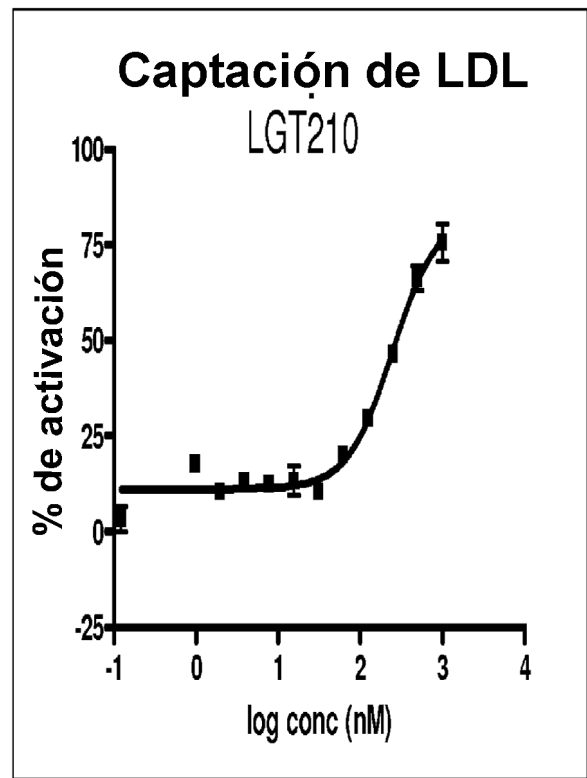
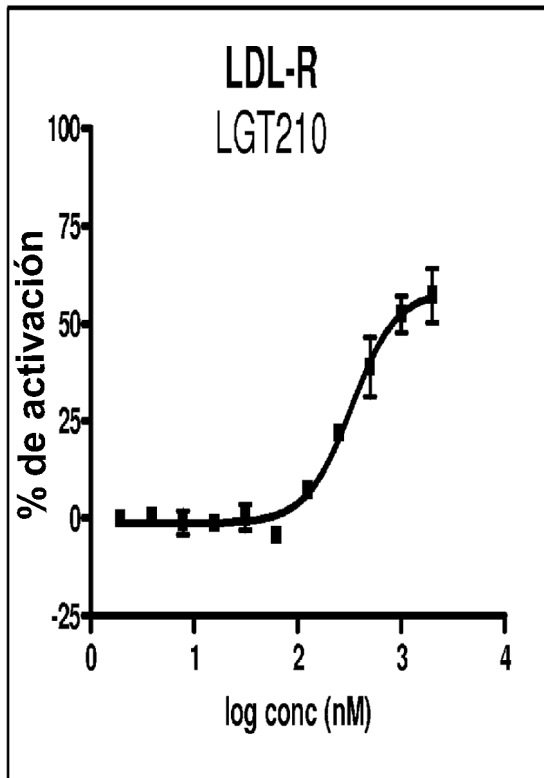
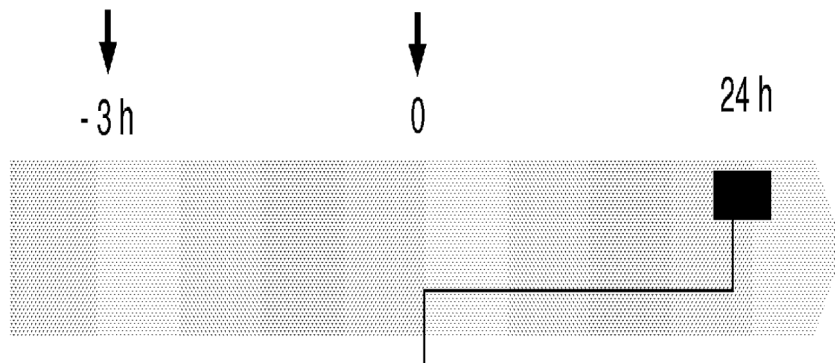


Figura 10

Anticuerpo (*i.p.*) Minibomba osmótica de implante con hPcsk9



- Ratones C57BL/6J de origen natural (9 semanas de edad)
 - Alzet: 2001D (8 μ l/h, bomba de 24 h, 0.2 ml)
 - Infusión i.v. - minibomba implantada s.c. con catéter en la vena yugular
- No-HDL-C (Helena)
 - Coolesterol total (Olympus)
 - hPcsk9 (ELISA)
 - Anticuerpo (ELISA)

Grupos	Número de ratones
PBS (<i>i.p.</i>) + PBS (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	7
PBS (<i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h; <i>i.v.</i>)	7
mIgG (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h; <i>i.v.</i>)	5
LGT209 (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	7
LGT210 (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	5
LGT211 (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	7

Figura 11

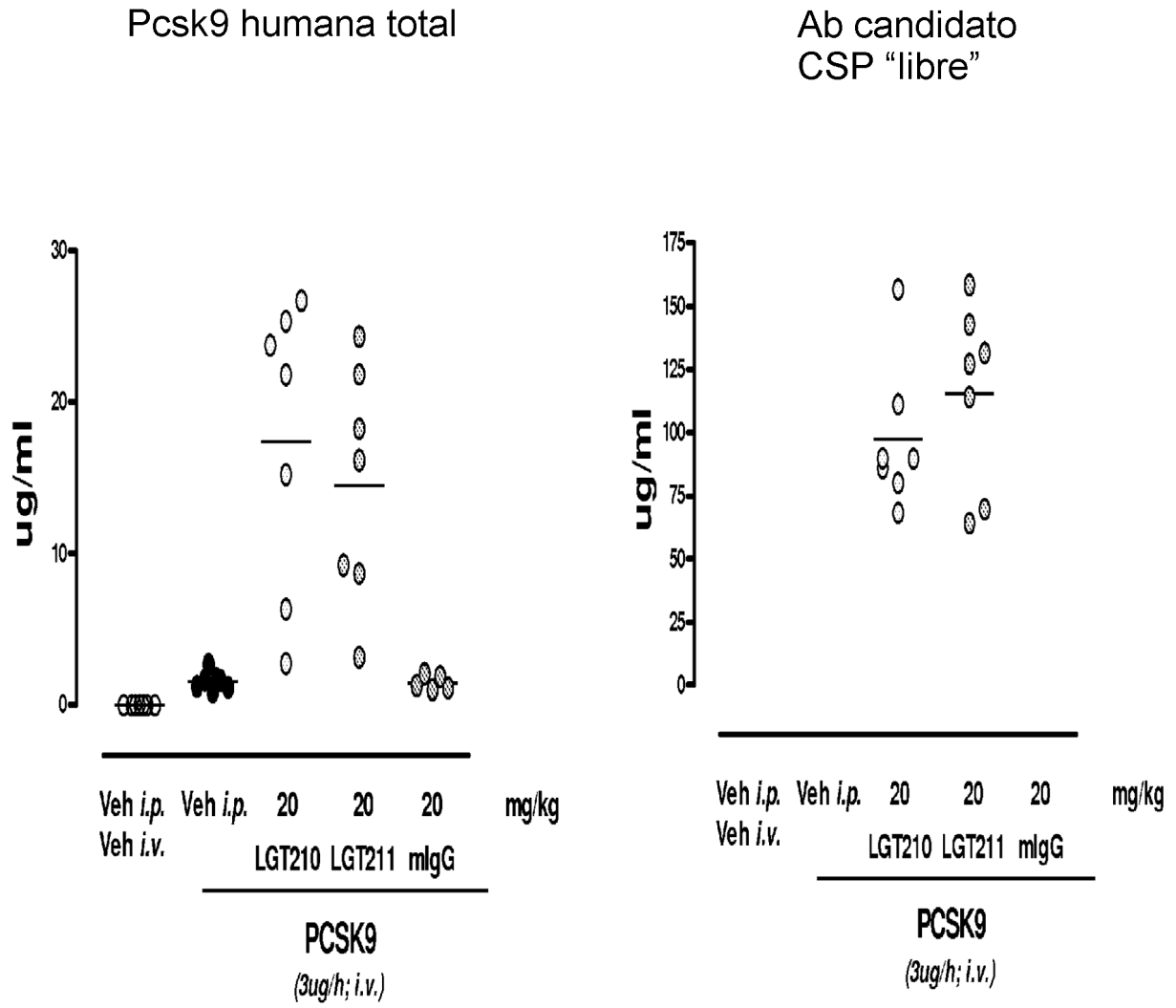


Figura 12

Inmunotransferencia de Western para LDL-R de preparados de membrana hepática

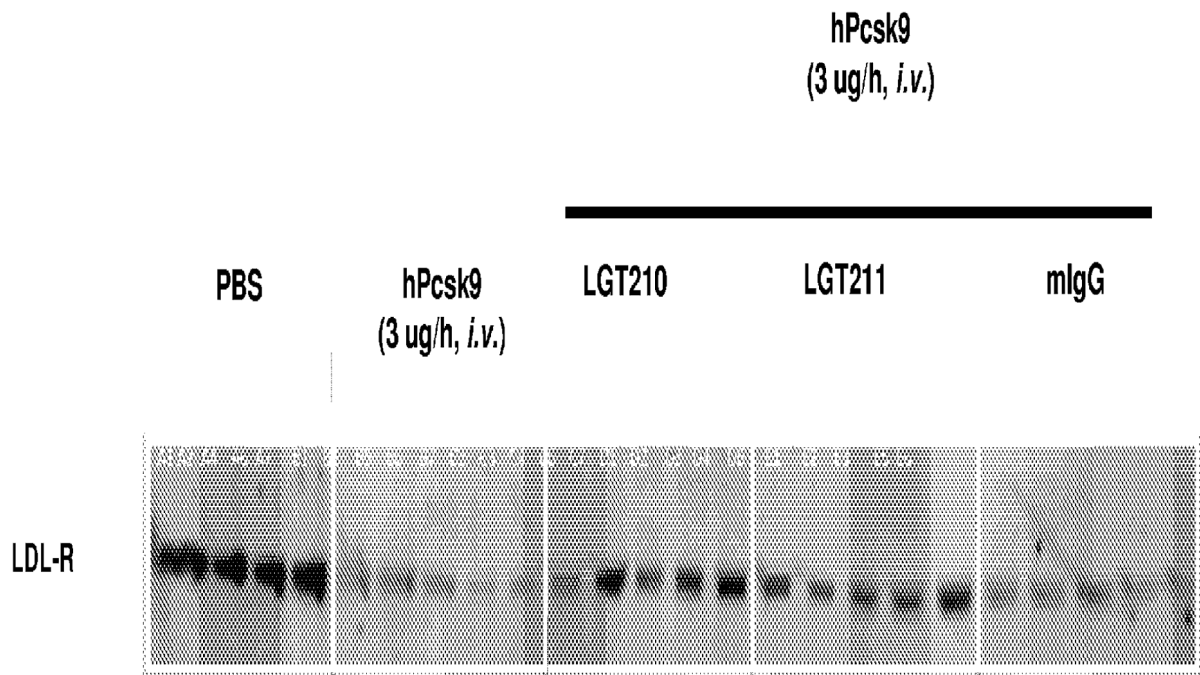
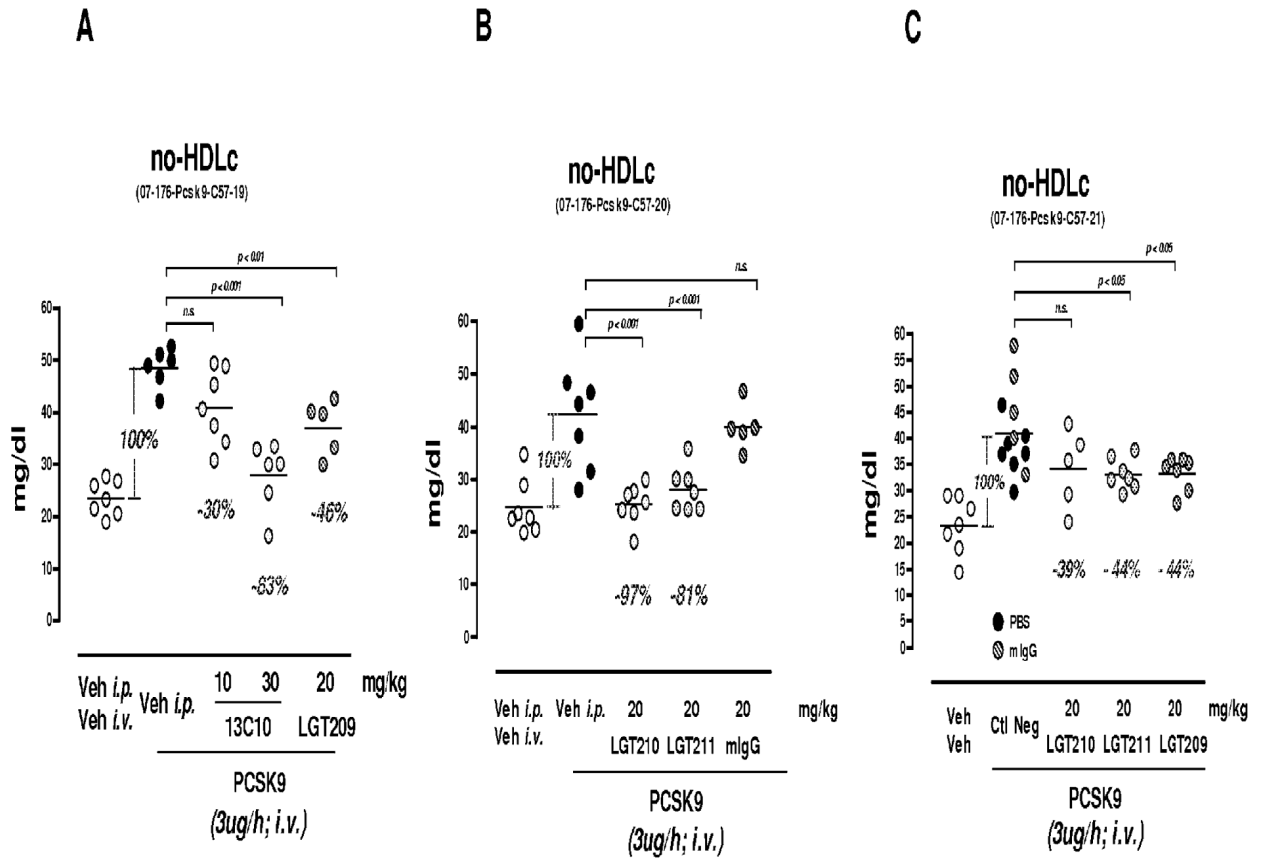


Figura 13



Anticuerpo	no-HDL-C A	no-HDL-C B	no-HDL-C C
LGT209	- 46% (p < 0.01)	-	- 44% (p < 0.05)
LGT210	-	- 97% (p < 0.001)	- 39% (n.s.)
LGT211	-	- 81% (p < 0.001)	- 44% (p < 0.05)

Figura 14

Perfil PK de mAb de IgG "típico" en ratas sin TMS
(línea sólida) - solapado con datos experimentales

