(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 810 907**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2013 PCT/US2013/039561**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13166448**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2013 E 13724077 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2844285**

(54) Título: **Formulaciones estables que contienen anticuerpos anti-PCSK9**

(30) Prioridad:

03.05.2012 US 201261642363 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2021

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive M/S 28-2-C
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

(72) Inventor/es:

CLOGSTON, CHRISTI L. y
OSSLUND, TIMOTHY DAVID

(74) Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

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

Formulaciones estables que contienen anticuerpos anti-PCSK9

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/642.363, presentada el 3 de mayo de 2012.

Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud incorpora por referencia en su totalidad toda la materia objeto contenida en el listado de secuencias adjunto, que se encuentra en formato txt identificado por el nombre de archivo, A-1635-US-NP2_Seq_List.txt, creado el miércoles, 1 de mayo de 2013, siendo el tamaño de dicho archivo de 306 KB.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento o la prevención de trastornos relacionados con el colesterol, tales como hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia, usando proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos, contra la proproteína convertasa subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9). También se describen formulaciones farmacéuticas y métodos para producir dichas formulaciones.

Antecedentes

Los "trastornos relacionados con el colesterol" (que incluyen "trastornos relacionados con el colesterol sérico") incluyen uno cualquiera o más de los siguientes: hipercolesterolemia, hiperlipidemia, cardiopatía, síndrome metabólico, diabetes, cardiopatía coronaria, ictus, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer y en general, dislipidemias, que pueden manifestarse, por ejemplo, por un colesterol sérico total elevado, LDL elevadas, triglicéridos elevados, VLDL elevadas y/o HDL elevadas. La hipercolesterolemia es, de hecho, un factor de riesgo establecido para la cardiopatía coronaria (CHD) en seres humanos. La reducción del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) da como resultado una reducción del riesgo cardiovascular y es un objetivo principal en la farmacoterapia para la CHD. Las estatinas (inhibidores de hidroximetilglutaril coenzima A [HMG CoA] reductasa) son en la actualidad el tratamiento de elección para la hipercolesterolemia. Sin embargo, cada vez más datos indican que un tratamiento más agresivo de la hipercolesterolemia se asocia con un menor riesgo de eventos de CHD. Además, un subconjunto de pacientes es intolerante o no responde adecuadamente a la terapia con estatinas. Por tanto, pueden ser útiles nuevas terapias que puedan usarse solas o en combinación con agentes existentes para reducir de manera más eficaz el LDL-C.

Está bien establecido que el reciclado del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) de la superficie celular hepática desempeña un papel crítico en el mantenimiento del equilibrio del colesterol celular y de todo el organismo mediante la regulación de los niveles plasmáticos de LDL-C. Más recientemente, se ha demostrado que la proproteína convertasa subtilisina/quexina de tipo 9 (PCSK9) desempeña un papel importante en el reciclado y la regulación del LDLR. PCSK9 es un miembro de la familia de subtilisina de serina proteasas y se expresa predominantemente en el hígado. Después de la secreción, provoca la regulación negativa postraduccional de LDLR de la superficie de células hepáticas mediante un mecanismo que implica la unión directa al LDLR. La regulación negativa del LDLR hepático, a su vez, da lugar a niveles aumentados de LDL-C circulante. Por lo tanto, PCSK9 puede representar una diana para inhibición mediante nuevos agentes terapéuticos en una situación de hipercolesterolemia. Hay disponible una sólida base argumental para dicha estrategia proveniente de estudios en modelos preclínicos y de observaciones de que los seres humanos con mutaciones de pérdida de función de PCSK9 tienen niveles de colesterol menores de lo normal y una incidencia reducida de CHD. El documento WO 2009/026558 A1 divulga formulaciones que comprenden proteínas de unión a antígeno dirigidas a PCSK9.

Sumario de diversas realizaciones

La invención es tal como se define en las reivindicaciones. Las "realizaciones" citadas más adelante en el presente documento son realizaciones como se reivindican o describen en el presente documento. En algunos aspectos, en el presente documento se describe un método para reducir el nivel sérico de colesterol asociado a LDL en un paciente. El método comprende administrar a un paciente que lo necesite una dosis de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1400 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 70 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez a la semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 45 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrada una vez a la semana. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 35 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrada una vez a la semana. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo

anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 105 mg a aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 280 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 4 semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir el nivel sérico de colesterol asociado a LDL en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir los valores de PCSK9 en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (Q2W); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (Q2W); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir el nivel de colesterol total en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (QW); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 60 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir el nivel sérico de colesterol no asociado a HDL en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (QW); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir los niveles de ApoB en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (QW); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 75 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir los niveles de lipoproteína A ("Lp(a)") en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo

anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (QW); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 10 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 15 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 65 %.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno relacionado con el colesterol en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que lo necesite una dosis de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 70 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez a la semana (QW). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 35 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrada una vez a la semana. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 70 mg a aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 105 mg a aproximadamente 350 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 280 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 480 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 4 semanas (Q4W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q2W). En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 420 mg de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 administrado una vez cada 2 semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 %. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con el colesterol es hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno relacionado con el colesterol en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente que no necesite, una dosis de al menos un anticuerpo anti-PCSK9 y en donde la dosis de anticuerpo anti-PCSK9 se administra con una pauta seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) al menos aproximadamente 14 mg cada semana (QW); (2) al menos una cantidad de aproximadamente 35 mg cada semana (QW); (3) al menos una cantidad de aproximadamente 70 mg cada dos semanas (QW); (4) al menos una cantidad de aproximadamente 105 mg cada dos semanas (QW); (5) al menos una cantidad de aproximadamente 140 mg cada dos semanas (Q2W); (6) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada dos semanas (Q2W); y (7) al menos una cantidad de aproximadamente 280 mg cada cuatro semanas (Q4W); (8) al menos una cantidad de aproximadamente 350 cada cuatro semanas (Q4W); (9) al menos una cantidad de aproximadamente 420 mg cada cuatro semanas (Q4W). En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, el

nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PCSK9 es 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 y/o 8A1.

En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con el colesterol es hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-PCSK9 seleccionado entre el grupo que consiste en 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 y 8A1.

Otras realizaciones serán fácilmente evidentes a partir de la divulgación proporcionada en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1A representa una secuencia de aminoácidos de la forma madura de la PCSK9 con el prodominio subrayado.
Las FIG. $1B_1$-$1B_4$ representan secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de PCSK9 con el prodominio subrayado y la secuencia de señal en negrita.
Las FIG. 2A-2D son tablas de comparación de secuencia de diversas cadenas ligeras de diversas proteínas de unión a antígeno. La FIG. 2C continúa la secuencia iniciada en la FIG. 2A. La FIG. 2D continúa la secuencia iniciada en la FIG. 2B.
Las FIG. 3A-3D son tablas de comparación de secuencia de diversas cadenas pesadas de diversas proteínas de unión a antígeno. La FIG. 3C continúa la secuencia iniciada en la FIG. 3A. La FIG. 3D continúa la secuencia iniciada en la FIG. 3B.
Las FIG. 3E-3JJ representan las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para los dominios variables de algunas realizaciones de las proteínas de unión a antígeno.
La FIG. 3KK representa las secuencias de aminoácidos para diversos dominios constantes.
Las FIG. 3LL-3BBB representan las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico para los dominios variables de algunas realizaciones de las proteínas de unión a antígeno.
Las FIG. 3CCC-3JJJ son tablas de comparación de secuencia de diversas cadenas pesadas y ligeras de algunas realizaciones de las proteínas de unión a antígeno.
La FIG. 4A es una curva de unión de una proteína de unión a antígeno para PCSK9 humana.
La FIG. 4B es una curva de unión de una proteína de unión a antígeno para PCSK9 humana.
La FIG. 4C es una curva de unión de una proteína de unión a antígeno para PCSK9 de cinomolgo.
La FIG. 4D es una curva de unión de una proteína de unión a antígeno para PCSK9 de cinomolgo.
La FIG. 4E es una curva de unión de una proteína de unión a antígeno para PCSK9 de ratón.
La FIG. 4F es una curva de unión de una proteína de unión a antígeno para PCSK9 de ratón.
La FIG. 5A representa los resultados de un experimento de SDS-PAGE que implica PCSK9 y varias proteínas de unión a antígeno que demuestra la pureza relativa y la concentración de las proteínas.
Las FIG. 5B y 5C representan gráficas de ensayos de equilibrio en solución Biacore para 21B12.
La FIG. 5D representa la gráfica de la cinética de un ensayo de captura Biacore.
La FIG. 5E representa un diagrama de barras que representan los resultados de preclasificación para tres ABP.
La FIG. 6A es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG2 31H4 dirigida contra PCSK9 en un ensayo de unión de PCSK9:LDLR *in vitro*.
La FIG. 6B es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG4 31H4 dirigida contra PCSK9 en un ensayo de unión de PCSK9:LDLR *in vitro*.
La FIG. 6C es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG2 21B12 dirigida contra PCSK9 en un ensayo de unión de PCSK9:LDLR *in vitro*.
La FIG. 6D es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG4 21B12 dirigida contra PCSK9 en un ensayo de unión de PCSK9:LDLR *in vitro*.
La FIG. 7A es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG2 31H4 en el ensayo de captación celular de LDL que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de la captación de LDL de PCSK9.
La FIG. 7B es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG4 31H4 en el ensayo de captación celular de LDL que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de la captación de LDL de PCSK9.
La FIG. 7C es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG2 21B12 en el ensayo de captación

celular de LDL que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de la captación de LDL de PCSK9.

La FIG. 7D es una curva de inhibición de la proteína de unión a antígeno IgG4 21B12 en el ensayo de captación celular de LDL que muestra el efecto de la ABP para reducir los efectos de bloqueo de la captación de LDL de PCSK9.

La FIG. 8A es una gráfica que representa la capacidad de reducción del colesterol sérico en ratones de la ABP 31H4, cambios en relación con los ratones tratados con IgG de control (* p< 0,01).

La FIG. 8B es una gráfica que representa la capacidad de reducción del colesterol sérico en ratones de la ABP 31H4, cambios en relación con tiempo = cero horas (# p, 0,05).

La FIG. 8C es una gráfica que representa el efecto de la ABP 31H4 en los niveles de colesterol asociado a HDL en ratones C57B1/6 (* p< 0,01).

La FIG. 8D es una gráfica que representa el efecto de la ABP 31H4 en los niveles de colesterol asociado a HDL en ratones C57B1/6 (# p< 0,05).

La FIG. 9 representa un análisis de transferencia de Western de la capacidad de la ABP 31H4 para potenciar la cantidad de proteína LDLR hepática presente después de varios puntos de tiempo.

La FIG. 10A es una gráfica que representa la capacidad de una proteína de unión a antígeno 31H4 para reducir el colesterol sérico total relativo en ratones de tipo silvestre.

La FIG. 10B es una gráfica que representa la capacidad de una proteína de unión a antígeno 31H4 para reducir las HDL en ratones de tipo silvestre.

La FIG. 10C es una gráfica que representa la capacidad reductora del colesterol sérico de diversas proteínas de unión a antígeno 31H4 y 16F12.

La FIG. 11A representa un protocolo de inyección para evaluar la duración y la capacidad de las proteínas de unión a antígeno para reducir el colesterol sérico.

La FIG. 11B es una gráfica que representa los resultados del protocolo en la FIG. 11A.

La FIG. 12A representa los niveles de LDLR en respuesta a la combinación de una estatina y la ABP 21B12 en células HepG2.

La FIG. 12B representa los niveles de LDLR en respuesta a la combinación de una estatina y la ABP 31H4 en células HepG2.

La FIG. 12C representa los niveles de LDLR en respuesta a la combinación de una estatina y la ABP 25A7.1, un anticuerpo no neutralizante, (a diferencia del anticuerpo neutralizante "25A7") en células HepG2.

La FIG. 12D representa los niveles de LDLR en respuesta a la combinación de una estatina y la ABP 21B12 en células HepG2 que sobreexpresan PCSK9.

La FIG. 12E representa los niveles de LDLR en respuesta a la combinación de una estatina y la ABP 31H4 en células HepG2 que sobreexpresan PCSK9.

La FIG. 12F representa los niveles de LDLR en respuesta a la combinación de una estatina y la ABP 25A7.1, un anticuerpo no neutralizante, (a diferencia del anticuerpo neutralizante "25A7") en células HepG2 que sobreexpresan PCSK9.

La FIG. 13A representa las diversas secuencias de aminoácidos de cadena ligera de varias ABP dirigidas contra PCSK9. Los puntos (.) indican un aminoácido ausente.

La FIG. 13B representa un cladograma de cadena ligera para diversas ABP dirigidas contra PCSK9.

La FIG. 13C representa las diversas secuencias de aminoácidos de cadena pesada de varias ABP dirigidas contra PCSK9. Los puntos (.) indican un aminoácido ausente.

La FIG. 13D representa un dendrograma de cadena pesada para varias ABP dirigidas contra PCSK9.

La FIG. 13E representa una comparación de las CDR de cadena ligera y pesada y la designación de grupos de los que obtener consenso.

La FIG. 13F representa las secuencias consenso para los grupos 1 y 2.

La FIG. 13G representa las secuencias consenso para los grupos 3 y 4.

La FIG. 13H representa las secuencias consenso para los grupos 1 y 2. Los puntos (.) indican restos idénticos.

La FIG. 13I representa las secuencias consenso para el grupo 2. Los puntos (.) indican restos idénticos.

La FIG. 13J representa las secuencias consenso para los grupos 3 y 4. Los puntos (.) indican restos idénticos.

La FIG. 14 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de LDL-c en pacientes que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 15 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de LDL-c en pacientes tratados con estatinas a dosis de moderadas a elevadas que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 16 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de ApoB en pacientes que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 17 es una gráfica de barras que muestra la reducción los niveles de lipoproteína a ("Lp(a)") en pacientes tratados con estatinas a dosis de moderadas a elevadas que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 18 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de LDL-c en pacientes que tienen hipercolesterolemia heterocigótica familiar ("HeFH") que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 19 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de PCSK9 en pacientes que tienen hipercolesterolemia heterocigótica familiar ("HeFH") que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 20 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de colesterol total en pacientes que tienen

hipercolesterolemia heterocigótica familiar ("HeFH") que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 21 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de colesterol no-HDL en pacientes que tienen hipercolesterolemia heterocigótica familiar ("HeFH") que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 22 es una gráfica que muestra la reducción de los niveles de ApoB en pacientes que tienen hipercolesterolemia heterocigótica familiar ("HeFH") que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 23 es un diagrama de barras que muestra la reducción de lipoproteína a ("Lp(a)") en pacientes que tienen hipercolesterolemia heterocigótica familiar ("HeFH") que reciben múltiples dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12).

La FIG. 24A es una gráfica que muestra los datos agregados relativos a la reducción de LDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron varias dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) cada dos semanas (Q2W) a lo largo de un periodo de 12 semanas.

La FIG. 24B es una gráfica que muestra los datos agregados relativos a la reducción de LDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron varias dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) cada cuatro semanas (Q4W) a lo largo de un periodo de 12 semanas.

La FIG. 25A es un diagrama de barras que muestra los datos agregados relativos a la reducción de Lp(a) en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron varias dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) bien cada dos semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) a lo largo de un periodo de 12 semanas.

La FIG. 25B es un diagrama de barras que muestra los datos agregados relativos a la reducción de HDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron varias dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) bien cada dos semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) a lo largo de un periodo de 12 semanas.

La FIG. 25C es un diagrama de barras que muestra los datos agregados relativos a la reducción de triglicéridos en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron varias dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) bien cada dos semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) a lo largo de un periodo de 12 semanas.

La FIG. 25D es un diagrama de barras que muestra los datos agregados relativos a la reducción de VLDL-C en pacientes de cuatro estudios descritos en los ejemplos 22-25 que recibieron varias dosis de un anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) bien cada dos semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) a lo largo de un periodo de 12 semanas.

La FIG. 26 es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de formulaciones de anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) que contienen diversos estabilizantes/excipientes.

La FIG. 27 es una gráfica que muestra que el estabilizante/excipiente, prolina, tiene la capacidad de reducir la viscosidad de las formulaciones de anticuerpo anti-PCSK9 (21B12) que tienen elevadas concentraciones de proteína.

La FIG. 28A es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C.

La figura 28B es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende acetato de sodio 10 mM, arginina 125 mM y sacarosa al 3 % a pH 5,0 a 25 °C y 40 °C.

La figura 28C es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende acetato de sodio 10 mM, metionina 100 mM y sacarosa al 4 % a pH 5,0 a 25 °C y 40 °C.

La figura 28D es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende acetato de sodio 10 mM y prolina 250 mM, a pH 5,0 a 25 °C y 40 °C.

La FIG. 29A es un diagrama de barras que muestra el número de partículas de 10 µm en diversas formulaciones de anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 21B12) a lo largo de un periodo de 6 minutos.

La FIG. 29B es un diagrama de barras que muestra el número de partículas de 25 µm en diversas formulaciones de anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 21B12) a lo largo de un periodo de 6 minutos.

La FIG. 30A es un diagrama de barras que muestra el número de partículas de 10 µm en diversas formulaciones de anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 11F1) a lo largo de un periodo de 4 minutos.

La FIG. 30B es un diagrama de barras que muestra el número de partículas de 25 µm en diversas formulaciones de anticuerpo anti-PCSK9 (es decir, 11F1) a lo largo de un periodo de 4 minutos.

La figura 31 es una gráfica que ilustra la especificidad de unión de 11F1 en un ensayo de competición con PCSKP, PCSK2, PCSK1, PCSK7 y furina con la DO_{450} representada en el eje vertical y la concentración de PCSK9 (ug/ml) representada en el eje horizontal.

La figura 32 es una gráfica que muestra la curva de respuesta a la dosis para la inhibición de la unión de PCSK9 a LDLR:D374Y mediante 11F1 en un ensayo de competición, con la DO_{450} representada en el eje vertical y el Log [11F1] (pM) representado en el eje horizontal.

La figura 33 es una gráfica que representa la curva de respuesta a la dosis para la inhibición de la unión de PCSK9 a LDLR:TS por 11F1 en un ensayo de competición, con la DO_{450} representada en el eje vertical y el Log [11f1] (pM) representado en el eje horizontal.

La figura 34 es una gráfica que representa la curva de respuesta a la dosis para la capacidad de 11F1 para bloquear la reducción de la captación de LDL mediada por D374Y PCSK9 humana en células HepG2, con las unidades de fluorescencia relativas ($x10^4$) representadas en el eje vertical y el Log [11F1] (nM) representado en el eje horizontal.

La figura 35 es una gráfica que representa la curva de respuesta a la dosis para la capacidad de 11F1 para bloquear la reducción de la captación de LDL mediada por TS PCSK9 humana en células HepG2, con las unidades de fluorescencia relativas representadas($x10^4$) en el eje vertical y el Log [11F1] (nM) representado en el eje horizontal.

La figura 36 es un diagrama de barras que representa el efecto de 11F1 y 8A3 en el colesterol no-HDL sérico en ratones que expresan PCSK9 humana mediante AAV con la concentración sérica de no-HDL-C (mg/ml) en el eje vertical y el tiempo después de la inyección (días) representado en el eje horizontal.

La figura 37 es un diagrama de barras que representa el efecto de 11F1 y 8A3 en el colesterol sérico total en ratones que expresan PCSK9 humana mediante AAV con el colesterol sérico total (mg/ml) en el eje vertical y el tiempo después de la inyección (días) representado en el eje horizontal.

La figura 38 es un diagrama de barras que representa el efecto de 11F1 y 8A3 en el colesterol asociado a HDL sérico (HDL-C) en ratones que expresan PCSK9 humana mediante AAV con el HDL-C (mg/ml) en el eje vertical y el tiempo después de la inyección (días) representado en el eje horizontal.

La figura 39 es una gráfica que representa los perfiles de concentración de anticuerpo IgG2 8A3 y 11F1 en ratones que expresan PCSK9 humana mediante AAV con la concentración sérica de anticuerpo (ng/ml) representada en el eje vertical y el tiempo después de la inyección en días representado en el eje horizontal.

La figura 40 es una tabla que resume los parámetros PK para las IgG2 11F1 y 8A3 en ratones que expresan PCSK9 humana mediante AAV.

La figura 41 es una gráfica que representa el efecto de una sola administración subcutánea de un anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en la concentración sérica de LDL (LDL-C) en monos cinomolgos, con LDL-C (mg/dl) representado en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

La figura 42 es una gráfica que representa el efecto de una sola administración subcutánea de un anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en el colesterol sérico total en monos cinomolgos, con la concentración de colesterol total (mg/dl) representada en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

La figura 43 es una gráfica que representa el efecto de una sola administración subcutánea de un anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en el colesterol asociado a HDL sérico en monos cinomolgos, con HDL-C (mg/dl) representado en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

La figura 44 es una gráfica que representa el efecto de una sola administración subcutánea de un anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en los triglicéridos séricos en monos cinomolgos, con la concentración de triglicéridos séricos (mg/dl) representada en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

La figura 45 es una gráfica que representa el efecto de una sola administración subcutánea de un anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en la apolipoproteína B (ApoB) en monos cinomolgos, con la concentración de APOB (mg/dl) representada en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

La figura 46 es una gráfica que representa los perfiles farmacocinéticos medios para el anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en monos cinomolgos, con las concentraciones de anticuerpo (ng/ml) representadas en el eje vertical y el tiempo después de la administración en días en el eje horizontal.

La figura 47 es una tabla que resume los parámetros PK para el anticuerpo anti-KLH (control), 21B12, 8A3 y 11F1 en monos cinomolgos.

Descripción detallada de ciertas realizaciones ejemplares

En el presente documento se divulgan proteínas de unión a antígeno (tales como anticuerpos y fragmentos de unión funcionales de los mismos) que se unen a PCSK9. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se unen a PCSK9 e impiden el funcionamiento de PCSK9 de varias maneras. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno bloquea o reduce la capacidad de PCSK9 para interactuar con otras sustancias. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a PCSK9 de un modo que impide o reduce la probabilidad de que PCSK9 se una a LDLR. En otras realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se unen a PCSK9 pero no bloquean la capacidad de PCSK9 para interactuar con LDLR. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno son anticuerpos monoclonales humanos.

Como apreciará un experto en la materia, a la luz de la presente divulgación, la alteración de las interacciones entre PCSK9 y LDLR puede aumentar la cantidad de LDLR disponible para su unión a LDL, lo que a su vez reduce la cantidad de LDL sérico en un sujeto, dando como resultado una reducción en el nivel sérico de colesterol en el sujeto. Como tales, las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 pueden usarse en diversos métodos y formulaciones para tratar a sujetos con niveles séricos de colesterol elevados, en riesgo de tener niveles séricos de colesterol elevados o que podrían beneficiarse de una reducción en sus niveles séricos de colesterol. Por tanto, también se describen en el presente documento diversos métodos y técnicas para reducir, mantener o prevenir un aumento en el colesterol sérico. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno permite la unión entre PCSK9 y LDLR, pero la proteína de unión a antígeno previene o reduce la actividad adversa de PCKS9 sobre LDLR. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno previene o reduce la unión de PCSK9 a LDLR.

Por conveniencia, las secciones a continuación indican de manera general los diversos significados de los términos

usados en el presente documento. Después de este análisis, se analizan aspectos generales referentes a proteínas de unión a antígeno, seguidos de ejemplos específicos que demuestran las propiedades de diversas realizaciones de las proteínas de unión a antígeno y cómo pueden emplearse.

Definiciones y realizaciones

Ha de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son tan solo ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención como se reivindica. En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente otra cosa. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique otra cosa. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Asimismo, los términos, tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente otra cosa. Asimismo, el uso del término "porción" puede incluir parte de un resto o el resto completo.

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente, y no deben considerarse como limitantes de la materia objeto descrita. Como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, ha de entenderse que los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, tienen los siguientes significados:

La expresión "proproteína convertasa subtilisina/quexina tipo 9" o "PCSK9" se refiere a un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 1 y/o 3 o fragmentos del mismo, así como polipéptidos relacionados, que incluyen, pero sin limitación, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, variantes derivadas, variantes de sustitución, variantes de eliminación y/o variantes de inserción que incluyen la adición de una metionina N-terminal, polipéptidos de fusión y homólogos entre especies. En determinadas realizaciones, un polipéptido de PCSK9 incluye restos terminales, tales como, pero sin limitación, restos de la secuencia líder, restos de direccionamiento, restos de metionina amino terminales, restos de lisina, restos de marcador y/o restos de proteína de fusión. "PCSK9" también se ha denominado FH3, NARC1, HCHOLA3, proproteína convertasa subtilisina/quexina tipo 9 y convertasa neural 1 regulada por apoptosis. El gen de PCSK9 codifica una proteína proproteína convertasa que pertenece a la subfamilia de proteinasa K de la familia de subtilasas secretorias. El término "PCSK9" indica tanto la proproteína como el producto generado después de la autocatálisis de la proproteína. Cuando se hace referencia únicamente al producto autocatalizado (tal como para una proteína de unión a antígeno que se une selectivamente a la PCSK9 escindida), la proteína puede citarse como la PCSK9 "madura", "escindida", "procesada" o "activa". Cuando se hace referencia únicamente a la forma inactiva, la proteína puede citarse como la forma "inactiva", de "proforma" o "no procesada" de PCSK9. El término PCSK9, como se usa en el presente documento, también incluye alelos de origen natural, tales como las mutaciones D374Y, S127R y F216L. El término PCSK9 también abarca moléculas de PCSK9 que incorporan modificaciones postraduccionales de la secuencia de aminoácidos de PCSK9, tales como secuencias de PCSK9 que se han glucosilado, PEGilado, secuencias de PCSK9 de las que se ha escindido la secuencia de señal, secuencias de PCSK9 de las que se ha escindido su prodominio del dominio catalítico pero que no se han separado del dominio catalítico (por ejemplo, las FIG. 1A y 1B).

La expresión "actividad PCSK9" incluye cualquier efecto biológico de PCSK9. En determinadas realizaciones, la actividad PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 para interactuar o unirse a un sustrato o receptor. En algunas realizaciones, la actividad PCSK9 se representa por la capacidad de PCSK9 para unirse a un receptor de LDL (LDLR). En algunas realizaciones, PCSK9 se une a y cataliza una reacción que implica LDLR. En algunas realizaciones, la actividad PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 para alterar (por ejemplo, reducir) la disponibilidad de LDLR. En algunas realizaciones, la actividad PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 para aumentar la cantidad de LDL en un sujeto. En algunas realizaciones, la actividad PCSK9 incluye la capacidad de PCSK9 para reducir la cantidad de LDLR que se encuentra disponible para su unión a LDL. En algunas realizaciones, la "actividad PCSK9" incluye cualquier actividad biológica que resulta de la señalización de PCSK9. Las actividades ejemplares incluyen, pero sin limitación, la unión de PCSK9 a LDLR, la actividad enzimática de PCSK9 que escinde LDLR u otras proteínas, la unión de PCSK9 a proteínas distintas de LDLR que facilitan la acción de PCSK9, la alteración por PCSK9 de la secreción de APOB (Sun X-M et al., "Evidence for effect of mutant PCSK9 on apoliprotein B secretion as the cause of unusually severe dominant hypercholesterolemia", Human Molecular Genetics 14: 1161-1169, 2005 y Ouguerram K et al, "Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9", Arterioscler thromb Vasc Biol. 24: 1448-1453, 2004), el papel de PCSK9 en la regeneración hepática y la diferenciación de células neuronales (Seidah NG et al., "The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): Liver regeneration and neuronal differentiation" PNAS 100: 928-933, 2003) y el papel de PCSK9 en el metabolismo de la glucosa hepática (Costet *et al.*, "Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c" J. Biol. Chem. 281(10):6211-18, 2006).

El término "hipercolesterolemia", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección en la que los niveles de colesterol están elevados por encima de un nivel deseado. En algunas realizaciones, esto indica que los niveles séricos de colesterol están elevados. En algunas realizaciones, el nivel deseado toma en cuenta varios "factores de riesgo" que son conocidos por un experto en la materia (y se describen o citan en el presente documento).

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" incluye polímeros de nucleótidos tanto monocatenarios como bicatenarios. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o

desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los dos tipos de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases, tales como derivados de bromouridina e inosina, modificaciones de ribosa, tales como 2',3'-didesoxirribosa y modificaciones de enlace entre nucleótidos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforoaniladato y fosforamidato.

El término "oligonucleótido" significa un polinucleótido que comprende 200 o menos nucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases. En otras realizaciones, los oligonucleótidos tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos codificantes o no codificantes. Un oligonucleótido puede incluir un marcador, incluyendo un radiomarcador, un marcador fluorescente, un hapteno o un marcador antigénico, para ensayos de detección. Los oligonucleótidos pueden usarse, por ejemplo, como cebadores para la PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" significa un ARN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos que no está asociada con la totalidad o una porción de un polinucleótido en la que se encuentra el polinucleótido aislado en la naturaleza o está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza. A efectos de la presente divulgación, ha de entenderse que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos particular no abarca cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aisladas "que comprenden" secuencias de ácido nucleico específicas pueden incluir, además de las secuencias especificadas, secuencias codificantes para hasta diez o incluso hasta veinte proteínas distintas o porciones de las mismas o pueden incluir secuencias reguladoras unidas operativamente que controlan la expresión de la región codificante de las secuencias de ácido nucleico citadas y/o pueden incluir secuencias de vector.

A menos que se especifique otra cosa, el extremo izquierdo de cualquier secuencia de polinucleótido monocatenaria analizada en el presente documento es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se cita como la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se cita como la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que se encuentran en 5' respecto del extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que se encuentran en 3' respecto del extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena abajo". La expresión "secuencia de control" se refiere a una secuencia de polinucleótido que puede afectar a la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que está ligada. La naturaleza de dichas secuencias de control puede depender del organismo hospedador. En realizaciones particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión ribosomal y una secuencia de terminación de la transcripción. Por ejemplo, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias de terminación de la transcripción. Las "secuencias de control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias de compañero de fusión. El término "vector" significa cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) usada para transferir información codificante de proteínas a una célula hospedadora.

La expresión "vector de expresión" o "construcción de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula hospedadora) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas operativamente a las mismas. Una construcción de expresión puede incluir, pero sin limitación, secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción y, en caso de que haya presencia de intrones, afectan al corte y empalme de ARN de una región codificante unida operativamente a las mismas.

Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" significa que los componentes a los que se aplica el término se encuentran en una relación que les permite llevar a cabo sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control en un vector que está "unida operativamente" a una secuencia codificante de proteína, está ligada a la misma de tal forma que se logra la expresión de la secuencia codificante de proteína en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control. La expresión "célula hospedadora" significa una célula que se ha transformado o tiene la capacidad de transformarse, con una secuencia de ácido nucleico y de este modo, expresa un gen de interés. El término incluye la descendencia de la célula precursora, ya sea idéntica o no la descendencia en cuanto a su morfología o composición genética a la de la célula precursora original, en tanto que esté presente el gen de interés.

El término "transfección" significa la captación de ADN extraño o exógeno por una célula y una célula se ha "transfectado" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Se conoce bien en la técnica una serie técnicas de transfección y se divulgan en el presente documento. Véase, por ejemplo, Graham et al., 1973, Virology 52:456; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, anteriormente citado; Davis *et al.*, 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al., 1981, Gene 13:197. Dichas técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógenos en células hospedadoras adecuadas.

El término "transformación" se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para que contenga ADN o ARN nuevo. Por ejemplo, una célula está transformada en caso de que esté genéticamente modificada con respecto a su estado nativo mediante la introducción de nuevo material genético mediante transfección, transducción u otras técnicas. Después de la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en el cromosoma de la célula o puede mantenerse transitoriamente como un elemento episómico sin

replicarse o puede replicarse de manera independiente como un plásmido. Se considera que una célula se ha "transformado de manera estable" cuando el ADN transformante se replica con la división de la célula.

Los términos "polipéptido" o "proteína" significan una macromolécula que tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína nativa, es decir, una proteína producida por una célula de origen natural y no recombinante; o se produce por una célula modificada por ingeniería genética o recombinante y comprende moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa o moléculas que tienen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia nativa. El término también incluye polímeros de aminoácidos en los que uno o más aminoácidos son análogos químicos de un aminoácido correspondiente de origen natural y polímeros. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente proteínas de unión a antígeno, anticuerpos o secuencias que tienen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9. La expresión "fragmento de polipéptido" se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación aminoterminal, una eliminación carboxiterminal y/o una eliminación interna, en comparación con la proteína nativa de longitud completa. Dichos fragmentos también pueden contener aminoácidos modificados, en comparación con la proteína nativa. En determinadas realizaciones, los fragmentos son de aproximadamente cinco a 500 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, los fragmentos pueden tener al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos de polipéptido útiles incluyen fragmentos inmunológicamente funcionales de anticuerpos, incluyendo dominios de unión. En el caso de un anticuerpo de unión a PCSK9, los fragmentos útiles incluyen, pero sin limitación, una región CDR, un dominio variable de una cadena pesada y/o ligera, una porción de una cadena de anticuerpo o solo su región variable que incluye dos CDR y similares.

La expresión "proteína aislada" significa que una proteína concreta (1) está libre de al menos alguna otra proteína con la que normalmente podría encontrarse, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie distinta, (4) se ha separado de al menos un 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, carbohidratos y otros materiales con los que está asociada en la naturaleza, (5) está asociada operativamente (mediante interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza o (6) no se produce en la naturaleza. Normalmente, una "proteína aislada" constituye al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 % o al menos aproximadamente un 50 % de una muestra dada. El ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético o cualquier combinación de los mismos puede codificar dicha proteína aislada. Preferentemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su ambiente natural que podrían interferir con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación u otros.

El término "aminoácido" incluye su significado normal en la técnica.

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno o un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más restos de aminoácido se insertan, eliminan y/o sustituyen en la secuencia de aminoácidos en relación con otra secuencia polipeptídica. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

El término "identidad" se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptido o dos o más moléculas de ácido nucleico, determinada mediante alineamiento y comparación de las secuencias. El "porcentaje de identidad" significa el porcentaje de restos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas y se calcula basándose en el tamaño de la más pequeña de las moléculas que se estén comparando. Para estos cálculos, los huecos en los alineamientos (en caso de haberlos) se abordan preferentemente mediante un modelo matemático o programa informático particular (es decir, un "algoritmo"). Los métodos que pueden usarse para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o los polipéptidos alineados incluyen los descritos en Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, Nueva York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, Nueva York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.), 1994, Nueva Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, Nueva York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, Nueva York: M. Stockton Press; y Carillo *et al.*, 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073.

Al calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se están comparando normalmente se alinean de un modo que proporciona el máximo grado de coincidencia entre las secuencias. Un ejemplo de un programa informático que puede usarse para determinar el porcentaje de identidad es el paquete informático GCG, que incluye GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). El algoritmo informático GAP se usa para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se va a determinar el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias se alinean para un emparejamiento óptimo de sus aminoácidos o nucleótidos respectivos (el "tramo emparejado", determinado por el algoritmo). Se usan junto con el algoritmo una penalización por apertura de hueco (que se calcula como 3x la diagonal media, en donde la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación que se está usando; la "diagonal" es la puntuación el número asignado a cada coincidencia de aminoácido perfecta por la matriz de comparación) y una penalización por extensión de hueco (que normalmente es 1/10 veces la penalización por apertura de hueco), así como una matriz de comparación, tal como PAM 250 o BLOSum 62. En determinadas realizaciones, el algoritmo también emplea una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff *et al.*, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSum 62).

Los ejemplos de parámetros que pueden emplearse a la hora de determinar el porcentaje de identidad para secuencias de polipéptidos o nucleótidos usando el programa GAP son los siguientes:

- Algoritmo: Needleman *et al.*, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453
- Matriz de comparación: BLOSum 62 de Henikoff *et al.,* 1992, anteriormente citado
- Penalización por hueco: 12 (pero sin penalización por huecos terminales)
- Penalización por longitud de hueco: 4
- Umbral de similitud: 0

Ciertos esquemas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el emparejamiento de tan solo una región corta de las dos secuencias y esta región pequeña alineada puede tener una identidad de secuencia muy elevada, incluso a pesar de que no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) puede ajustarse, si así se desea, para dar como resultado un alineamiento que abarca al menos 50 u otro número de aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales (por ejemplo, de origen natural) y sus abreviaturas siguen su uso convencional. Véase Immunology--A Synthesis (2.ª edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales, tales como aminoácidos α-,α-disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico u otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, s-N,N,N-trimetil lisina, s-N-acetil lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección hacia la izquierda es la dirección aminoterminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxiterminal, de acuerdo con el uso y la convención convencional.

De forma similar, a menos que se especifique otra cosa, el extremo izquierdo de cualquier secuencia de polinucleótido monocatenaria es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarias se cita como la dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de los transcritos de ARN nacientes se cita como la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que se encuentran en 5' respecto del extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena arriba"; las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que se encuentran en 3' respecto del extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias cadena abajo".

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden abarcar restos de aminoácidos de origen no natural, que normalmente se incorporan mediante síntesis peptídica en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácidos.

Los restos de origen natural pueden dividirse en clases basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
3) ácidos: Asp, Glu;
4) básicos: His, Lys, Arg;
5) restos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos restos sustituidos pueden introducirse, por ejemplo, en regiones de un anticuerpo humano que son homólogas a las de anticuerpos no humanos o en las regiones no homólogas de la molécula.

Al hacerse cambios en la proteína de unión a antígeno o la proteína PCSK9, de acuerdo con determinadas realizaciones, puede tenerse en consideración el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobia y carga. Estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Se comprende la importancia del índice hidropático de aminoácidos a la hora de conferir una función biológica interactiva a una proteína. Kyte *et al.,* J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Se sabe que pueden sustituirse ciertos aminoácidos por otros aminoácidos que tengan un índice hidropático o una puntuación similar y que sigan conservando una actividad biológica similar. Al hacer cambios basados en el índice hidropático, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran a ±2. En determinadas realizaciones, se incluyen aquellos que se encuentran a ±1 y en ciertas realizaciones, se incluyen aquellos a ±0,5.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede efectuarse eficazmente basándose en la hidrofilia, en particular cuando la proteína biológicamente funcional o el péptido creado de este modo está pensado para su uso en realizaciones inmunológicas, como es el presente caso. En determinadas realizaciones, la mayor hidrofilia media local de una proteína, regida por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, está correlacionada con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a estos restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al hacer cambios basándose en valores de hidrofilia similares, en ciertas realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia se encuentren a ±2, en ciertas realizaciones, se incluyen aquellos que se encuentran a ±1 y en ciertas realizaciones, se incluyen aquellos a ±0,5. También pueden identificarse epítopos de secuencias de aminoácidos primarias basándose en la hidrofilia. Estas regiones también se citan como "regiones centrales epitópicas".

Se exponen sustituciones de aminoácidos ejemplares en la tabla 1.

TABLA 1

Sustituciones de aminoácidos		
Restos originales	**Sustituciones ejemplares**	**Sustituciones preferentes**
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4-diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

El término "derivado" se refiere a una molécula que incluye una modificación química distinta de una inserción, eliminación o sustitución de aminoácidos (o ácidos nucleicos). En determinadas realizaciones, los derivados comprenden modificaciones covalentes, incluyendo, pero sin limitación, enlace químico con polímeros, lípidos u otros restos orgánicos o inorgánicos. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno químicamente modificada puede tener una mayor semivida en circulación que una proteína de unión a antígeno que no se ha modificado químicamente. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno químicamente modificada puede tener una capacidad de direccionamiento mejorada hacia células, tejidos y/u órganos deseados. En algunas realizaciones, se modifica covalentemente una proteína de unión a antígeno

derivada para que incluya una o más uniones de polímero hidrosolubles, incluyendo, pero sin limitación, polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno derivada comprende uno o más polímeros, incluyendo, pero sin limitación, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de carbohidratos, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, así como mezclas de dichos polímeros.

En determinadas realizaciones, un derivado de modifica covalentemente con subunidades de polietilenglicol (PEG). En determinadas realizaciones, se unen uno o más polímeros hidrosolubles en una o más posiciones específicas, por ejemplo, en el extremo amino, de un derivado. En determinadas realizaciones, se acoplan aleatoriamente uno o más polímeros a una o más cadenas laterales de un derivado. En determinadas realizaciones, PEG se usa para mejorar la capacidad terapéutica para una proteína de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, se usa PEG para mejorar la capacidad terapéutica para un anticuerpo humanizado. Se analizan algunos de estos métodos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.133.426.

Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J., Adv. Drug Res., 15:29 (1986); Veber y Freidinger, TINS, p.392 (1985); y Evans *et al.,* J. Med. Chem., 30:1229 (1987). Normalmente, dichos compuestos se desarrollan con la ayuda de modelado molecular computarizado. Los miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o una actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado entre: --CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2-CH_2--, --CH=CH-(cis y trans), --$COCH_2$--, --$CH(OH)CH_2$-- y --CH_2SO--, mediante métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse en ciertas realizaciones para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992); por ejemplo, mediante la adición de restos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan al péptido. La expresión "de origen natural", como se usa a lo largo de la memoria descriptiva en relación con materiales biológicos, tales como polipéptidos, ácidos nucleicos, células hospedadoras y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza o una forma de los materiales que se encuentra en la naturaleza.

Una "proteína de unión a antígeno" ("ABP"), como se usa en el presente documento, significa cualquier proteína que se une a un antígeno diana específico. En la presente solicitud, el antígeno diana especificado es la proteína PCSK9 o un fragmento de la misma. La "proteína de unión a antígeno" incluye, pero sin limitación, anticuerpo y partes de unión de los mismos, tales como fragmentos inmunológicamente funcionales. Los pepticuerpos son otro ejemplo de proteínas de unión a antígeno. La expresión "fragmento inmunológicamente funcional" (o simplemente "fragmento") de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno de cadena de inmunoglobulina (cadena ligera o pesada), como se usa en el presente documento, es una especie de proteína de unión a antígeno que comprende una porción (independientemente de cómo se obtenga o sintetice dicha porción) de un anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa, pero que sigue siendo capaz de unirse específicamente a un antígeno. Dichos fragmentos son biológicamente activos, en tanto que se unen al antígeno diana y pueden competir con otras proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos intactos, por la unión a un epítopo dado. En algunas realizaciones, los fragmentos son fragmentos neutralizantes. En algunas realizaciones, los fragmentos pueden bloquear o reducir la probabilidad de la interacción entre LDLR y PCSK9. En un aspecto, dicho fragmento conservará al menos una CDR presente en la cadena ligera o pesada de longitud completa y en algunas realizaciones, comprenderá una sola cadena pesada y/o cadena ligera o porción de la misma. Estos fragmentos biológicamente activos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o pueden producirse mediante escisión enzimática o química de proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos intactos. Los fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales incluyen, pero sin limitación, Fab, un diacuerpo (dominio variable de cadena pesada en el mismo polipéptido que un dominio variable de cadena ligera, conectado mediante un enlazador peptídico corto que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena), Fab', $F(ab')_2$, Fv, anticuerpos de dominio y anticuerpos monocatenarios y pueden proceder de cualquier fuente de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, ser humano, ratón, rata, camélido o conejo. Además, se contempla que una porción funcional de las proteínas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento, por ejemplo, una o más CDR, pueden estar unidas covalentemente a una segunda proteína o a una molécula pequeña para crear un agente terapéutico dirigido contra una diana particular en el organismo, que posee propiedades terapéuticas bifuncionales o que tiene una semivida en suero prolongada. Como apreciará un experto en la materia, una proteína de unión a antígeno puede incluir componentes no proteicos. En algunas secciones de la presente divulgación, los ejemplos de ABP se describen en el presente documento en términos de "número/letra/número" (por ejemplo, 25A7). En estos casos, el nombre exacto indica un anticuerpo específico. Es decir, una ABP denominada 25A7 no es necesariamente la misma que un anticuerpo denominado 25A7.1, (a menos que se enseñen explícitamente como iguales en la memoria descriptiva, por ejemplo, 25A7 y 25A7.3). Como apreciará un experto en la materia, en algunas realizaciones, LDLR no es una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, las subsecciones de unión de LDLR no

son proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, EGFa. En algunas realizaciones, otras moléculas a través de las cuales señaliza PCSK9 *in vivo* no son proteínas de unión a antígeno. Dichas realizaciones se identificarán explícitamente como tales.

Ciertas proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento son anticuerpos o derivan de anticuerpos. En determinadas realizaciones, la estructura polipeptídica de las proteínas de unión a antígeno está basada en anticuerpos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (en ocasiones citados en el presente documento como "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpo (en ocasiones citadas en el presente documento como "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de los mismos, respectivamente. En algunas realizaciones, la ABP comprende o consiste en avimeros (péptido de unión estrecha). Estas diversas proteínas de unión a antígeno se describen adicionalmente en el presente documento.

Una región "Fc" comprende dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_H1 y C_H2 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos mediante dos o más enlaces disulfuro y mediante interacciones hidrófobas de los dominios C_H3.

Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y las regiones C_H1 y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula de Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Un "fragmento Fab'" comprende una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio C_H1 y también la región entre los dominios C_H1 y C_H2, de tal forma que puede formarse un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula de $F(ab')_2$.

Un "fragmento $F(ab')_2$" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_H1 y C_H2, de tal forma que se forma un enlace disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento $F(ab')_2$ está compuesto, por tanto, de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos mediante un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes. Los "anticuerpos monocatenarios" son moléculas de Fv en las que se han conectado las regiones variables de cadena pesada y ligera por medio de un enlazador flexible para formar una sola cadena de polipéptido, que forma una región de unión a antígeno. Los anticuerpos monocatenarios se analizan en detalle en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente n.º WO 88/01649 y las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.946.778 y 5.260.203.

Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene únicamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, se unen covalentemente dos o más regiones V_H con un enlazador peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo o a diferentes antígenos.

Una "proteína de unión a antígeno bivalente" o un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades antigénicas. Las proteínas de unión a antígeno bivalentes y los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos, véase*, más adelante.* Un anticuerpo bivalente distinto de un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en ciertas realizaciones, se entiende que normalmente tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos.

Una "proteína de unión a antígeno multiespecífica" o un "anticuerpo multiespecífico" es uno que se dirige a más de un antígeno o epítopo.

Una proteína de unión a antígeno o anticuerpo "biespecífico", "específico dual" o "bifuncional" es una proteína de unión a antígeno o un anticuerpo híbrido, respectivamente, que tiene dos sitios de unión a antígeno diferentes. Las proteínas de unión a antígeno y los anticuerpos son una especie de proteínas de unión a antígeno o anticuerpo multiespecíficos y pueden producirse mediante diversos métodos que incluyen, pero sin limitación, la fusión de hibridomas o el enlace de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny *et al.,* 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Los dos sitios de unión de una proteína de unión a antígeno o anticuerpo biespecífico se unirán a dos epítopos diferentes, que pueden residir en dianas proteicas iguales o diferentes.

Se dice que una proteína de unión a antígeno se "une específicamente" a su antígeno diana cuando la constante de disociación (K_d) es $\leq 10^{-7}$ M. La ABP se une específicamente a un antígeno con "alta afinidad" cuando la K_d es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M y con "muy alta afinidad" cuando la K_d es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M. En una realización, la ABP tiene una K_d de $\leq 10^{-9}$ M. En una realización, la velocidad de disociación es $< 1 \times 10^{-5}$. En otras realizaciones, las ABP se unirán a PCSK9 humana con una K_d de entre aproximadamente 10^{-9} M y 10^{-13} M y en otra realización más, las ABP se unirán con una $K_d \leq 5 \times 10^{-10}$. Como apreciará un experto en la materia, en algunas realizaciones, cualquiera o todos los fragmentos de unión a antígeno pueden unirse específicamente a PCSK9.

Una proteína de unión a antígeno es "selectiva" cuando se une a una diana más estrechamente de lo que se une a una segunda diana. "Región de unión a antígeno" significa una proteína o una porción de una proteína, que se une específicamente a un antígeno especificado (por ejemplo, un parátopo). Por ejemplo, aquella porción de una proteína de unión a antígeno que contiene los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren a la proteína de unión a antígeno su especificidad y afinidad por el antígeno se cita como una "región de unión a antígeno". Una región de unión a antígeno incluye típicamente una o más "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"). Ciertas regiones de unión a antígeno también incluyen una o más regiones "marco". Una "CDR" es una secuencia de aminoácidos que contribuye a la especificidad y afinidad de unión a antígeno. Las regiones "marco" pueden ayudar a mantener la conformación adecuada de las CDR para promover la unión entre

la región de unión a antígeno y un antígeno. Estructuralmente, las regiones marco pueden estar ubicadas en los anticuerpos entre las CDR. Los ejemplos de regiones marco y CDR se muestran en las FIG. 2A-3D, 3CCC-3JJJ. En algunas realizaciones, las secuencias para las CDR para la cadena ligera del anticuerpo 3B6 son las siguientes: CDR1 TLSSGYSSYEVD (SEQ ID NO: 279); CDR2 VDTGGIVGSKGE (SEQ ID NO: 280); CDR3 GADHGSGTNFVVV (SEQ ID NO: 281) y las FR son las siguientes: FR1 QPVLTQPLFASASLGASVTLTC (SEQ ID NO: 282); FR2 WYQQRPGKGPRFVMR (SEQ ID NO: 283); FR3 GIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC (SEQ ID NO: 284); y FR4 FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 285).

En determinados aspectos, se proporcionan proteínas de unión a antígeno recombinantes que se unen a PCSK9, por ejemplo, PCSK9 humana. En este contexto, una "proteína de unión a antígeno recombinante" es una proteína producida usando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe en el presente documento. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de cualquier isotipo o a un fragmento de la misma que puede competir con el anticuerpo intacto por la unión específica al antígeno diana e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un "anticuerpo" es una especie de una proteína de unión a antígeno. Un anticuerpo intacto comprende generalmente al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, pero en algunos casos, pueden incluir menos cadenas, tales como los anticuerpos que se producen naturalmente en camélidos, que pueden comprender únicamente cadenas pesadas. Los anticuerpos pueden proceder únicamente de una fuente o pueden ser "quiméricos", es decir, las diferentes porciones del anticuerpo pueden proceder de dos anticuerpos distintos, como se describe con más detalle más adelante. Las proteínas de unión a antígeno, los anticuerpos o los fragmentos de unión pueden producirse en hibridomas, mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. A menos que se indique otra cosa, el término "anticuerpo" incluye, además de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, derivados, variantes, fragmentos y muteínas de los mismos, ejemplos de los cuales se describen a continuación. Además, a menos que se excluyan explícitamente, los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (en ocasiones citados en el presente documento como "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpo (en ocasiones citadas en el presente documento como "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de los mismos, respectivamente. En algunas realizaciones, el término también abarca pepticuerpos.

Las unidades estructurales de anticuerpo de origen natural normalmente comprenden un tetrámero. Cada uno de dichos tetrámeros está normalmente compuesto de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, en donde cada par tiene una cadena "ligera" de longitud completa (en ciertas realizaciones, de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (en ciertas realizaciones, de aproximadamente 50-70 kDa). La porción aminoterminal de cada cadena pesada incluye normalmente una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que normalmente es responsable del reconocimiento del antígeno. La porción carboxiterminal de cada cadena define normalmente una región constante que puede ser responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican normalmente como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican normalmente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Las IgG tienen varias subclases, incluyendo, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las IgM tienen subclases que incluyen, pero sin limitación, IgM1 y IgM2. Las IgA se subdividen igualmente en subclases que incluyen, pero sin limitación, IgA1 y IgA2. En las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, típicamente, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada que también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, cap. 7 (Paul, W., ed., 2.ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada normalmente forman el sitio de unión a antígeno.

Las regiones variables normalmente muestran la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas mediante tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par normalmente se alinean por las regiones marco, que pueden permitir la unión a un epítopo específico. De N-terminal a C-terminal, las regiones variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada normalmente comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es normalmente de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia *et al.,* Nature, 342:878-883 (1989).

En determinadas realizaciones, una cadena pesada de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una cadena ligera de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena pesada de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región de unión de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena ligera de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región de unión de anticuerpo se une a un antígeno en ausencia de una cadena pesada de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una región variable individual se específicamente a un antígeno en ausencia de otras regiones variables.

En determinadas realizaciones, la delineación definitiva de una CDR y la identificación de restos que comprenden el sitio de unión de un anticuerpo se logra resolviendo la estructura del anticuerpo y/o resolviendo la estructura del complejo de anticuerpo-ligando. En determinadas realizaciones, que pueden lograrse mediante cualquiera de una

variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia, tales como cristalografía de rayos X. En determinadas realizaciones, pueden emplearse diversos métodos de análisis para identificar o aproximar las regiones CDR. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, pero sin limitación, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición AbM y la definición de Contact.

La definición de Kabat es un estándar para numerar los restos en un anticuerpo y normalmente se usa para identificar las regiones CDR. Véase, por ejemplo, Johnson y Wu, Nucleic Acids Res., 28: 214-8 (2000). La definición de Chothia es similar a la definición de Kabat, pero la definición de Chothia toma en cuenta las posiciones de ciertas regiones de bucle estructural. Véase, por ejemplo, Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901-17 (1986); Chothia *et al.*, Nature, 342: 877-83 (1989). La definición AbM usa una suite integrada de programas informáticos producida por Oxford Molecular Group que modela la estructura del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Martin *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 86:9268-9272 (1989); "AbM™, A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies", Oxford, R. U.; Oxford Molecular, Ltd. La definición AbM modela la estructura terciaria de un anticuerpo a partir de la secuencia primaria usando una combinación de bases de datos de conocimientos y métodos desde el inicio, tales como aquellos descritos en Samudrala *et al.*, "Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach", en PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl., 3:194-198 (1999). La definición contact está basada en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Véase, por ejemplo, MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 5:732-45 (1996).

Por convención, las regiones CDR en la cadena pesada se citan normalmente como HI, H2 y H3 y se numeran secuencialmente en la dirección desde el extremo amino al extremo carboxilo. Las regiones CDR en la cadena ligera se citan normalmente como L1, L2 y L3 y se numeran secuencialmente en la dirección desde el extremo amino al extremo carboxilo.

La expresión "cadena ligera" incluye una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen suficiente secuencia de región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_L y un dominio de región constante, C_L. El dominio de región variable de la cadena ligera se encuentra en el extremo amino del polipéptido. Las cadenas ligeras incluyen cadenas kappa y cadenas lambda.

La expresión "cadena pesada" incluye una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen suficiente secuencia de región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, V_H y tres dominios de región constante, C_H1, C_H2 y C_H3. El dominio V_H se encuentra en el extremo amino del polipéptido y los dominios C_H se encuentran en el extremo carboxilo, encontrándose el C_H3 más próximo al extremo carboxilo del polipéptido. Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (incluyendo los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es normalmente un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de métodos que incluyen, pero sin limitación, la fusión de hibridomas o el enlace de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai *et al.*, Clin. Exp. Immunol., 79: 315-321 (1990); Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148:1547-1553 (1992).

Algunas especies de mamífero también producen anticuerpos que tienen únicamente una sola cadena pesada.

Cada una de las cadenas de inmunoglobulina individuales está compuesta normalmente de varios "dominios de inmunoglobulina", consistiendo cada uno de aproximadamente 90 a 110 aminoácidos y teniendo un patrón de plegado característico. Estos dominios son las unidades básicas de las que están compuestos los polipéptidos de anticuerpo. En seres humanos, los isotipos IgA e IgD contienen cuatro cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras; los isotipos IgG e IgE contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; y el isotipo IgM contiene cinco cadenas pesadas y cinco cadenas ligeras. La región C de cadena pesada comprenden normalmente uno o más dominios que pueden ser responsables de la función efectora. El número de dominios de región constante de cadena pesada dependerá del isotipo. Las cadenas pesadas de IgG, por ejemplo, contienen tres dominios de región C conocidos como C_H1, C_H2 y C_H3. Los anticuerpos que se proporcionan pueden tener cualquiera de estos isotipos y subtipos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-PCSK9 es de subtipo IgG2 o IgG4.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo, que incluyen normalmente aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos aminoterminales en la cadena pesada y aproximadamente los 100 a 110 aminoácidos aminoterminales en la cadena ligera. En determinadas realizaciones, las regiones variables de diferentes anticuerpos difieren en gran medida en su secuencia de aminoácidos incluso entre anticuerpos de la misma especie. La región variable de un anticuerpo determina normalmente la especificidad de un anticuerpo particular por su diana.

La expresión "proteína de unión a antígeno neutralizante" o "anticuerpo neutralizante" se refiere a una proteína de unión a antígeno o anticuerpo, respectivamente, que se une a un ligando y previene o reduce el efecto biológico de ese ligando. Esto se puede hacer, por ejemplo, dirigiendo el bloqueo de un sitio de unión en el ligando o mediante unión al ligando y alterando la capacidad del ligando para unirse por medios indirectos (tales como alteraciones estructurales o energéticas en el ligando). En algunas realizaciones, el término también puede indicar una proteína de unión a antígeno que impide que la proteína a la que se une lleve a cabo una función biológica. A la hora de evaluar la unión y/o especificidad de una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo, un anticuerpo o fragmento puede inhibir sustancialmente la unión de un ligando a su compañero de unión cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de compañero de unión unido al ligando en al menos aproximadamente un 1-20, 20-30 %, 30-40 %, 40-50 %, 50-60 %, 60-70 %, 70-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-97 %, 97-98 %, 98-99 % o más (medida en un ensayo de unión

competitiva *in vitro*). En algunas realizaciones, en el caso de proteínas de unión a antígeno de PCSK9, dicha molécula neutralizante puede reducir la capacidad de PCSK9 para unirse al LDLR. En algunas realizaciones, la capacidad neutralizante se caracteriza y/o describe mediante un ensayo de competición. En algunas realizaciones, la capacidad neutralizante se describe en términos de un valor de CI_{50} o CE_{50}. En algunas realizaciones, las ABP 27B2, 13H1, 13B5 y 3C4 son ABP no neutralizantes, 3B6, 9C9 y 31A4 son neutralizadores débiles y las demás ABP en la tabla 2 son neutralizadores fuertes. En algunas realizaciones, los anticuerpos o proteínas de unión a antígeno neutralizan por medio de la unión a PCSK9 y previenen la unión de PCSK9 a LDLR (o reducen la capacidad de PCSK9 para unirse a LDLR). En algunas realizaciones, los anticuerpos o ABP neutralizan mediante unión a PCSK9 y aunque siguen permitiendo la unión de PCSK9 a LDLR, impiden o reducen la degradación de LDLR mediada por PCSK9. Por tanto, en algunas realizaciones, una ABP o un anticuerpo neutralizante puede seguir permitiendo la unión de PCSK9/LDLR, pero impedirá (o reducirá) la posterior degradación de LDLR mediada por PCSK9.

El término "diana" se refiere a una molécula o a una porción de una molécula capaz de unirse a una proteína de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, una diana puede tener uno o más epítopos. En determinadas realizaciones, una diana es un antígeno. El uso de "antígeno" en la expresión "proteína de unión a antígeno" indica simplemente que la secuencia de proteína que comprende el antígeno puede unirse a un anticuerpo. En este contexto, no es necesario que la proteína sea exógena o que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria.

El término "competir", cuando se usa en el contexto de proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, proteínas de unión a antígeno neutralizantes o anticuerpos neutralizantes) que compiten por el mismo epítopo significa competición entre proteínas de unión a antígeno, como se determina mediante un ensayo en el que la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo) que se está ensayando previene o inhibe (por ejemplo, reduce) la unión específica de una proteína de unión a antígeno de referencia (por ejemplo, un ligando o un anticuerpo de referencia) a un antígeno común (por ejemplo, PCSK9 o un fragmento del mismo). Pueden usarse numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si una proteína de unión a antígeno compite con otra, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición en sándwich (véase, por ejemplo, Stahli *et al.*, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); EIA de biotina avidina directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Kirkland *et al.*, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619) ensayo marcado directamente en fase sólida, ensayo en sándwich marcado directamente en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA marcado directamente en fase sólida usando un marcador de I-125 (véase, por ejemplo, Morel *et al.*, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Cheung, *et al.*, 1990, Virology 176:546-552); y RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Normalmente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o a células que portan cualquiera de estos, una proteína de unión a antígeno no marcada y una proteína de unión a antígeno de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la proteína de unión a antígeno de ensayo. Normalmente, la proteína de unión a antígeno de ensayo está presente en exceso. Las proteínas de unión a antígeno identificadas mediante ensayo de competición (proteínas de unión a antígeno de competición) incluyen proteínas de unión a antígeno que se unen al mismo epítopo que las proteínas de unión a antígeno de referencia y proteínas de unión a antígeno que se unen a un epítopo adyacente suficientemente próximo al epítopo al que se une la proteína de unión a antígeno de referencia como para que se produzca impedimento estérico. Se proporcionan detalles adicionales relativos a métodos para determinar la unión competitiva en los ejemplos en el presente documento. Normalmente, cuando una proteína de unión a antígeno competitiva está presente en exceso, inhibirá (por ejemplo, reducirá) la unión específica de una proteína de unión a antígeno de referencia a un antígeno común en al menos un 40-45 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % o 75 % o más. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos un 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-97 % o 97 % o más.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o porción de una molécula capaz de unirse a un agente de unión selectivo, tal como una proteína de unión a antígeno (incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento inmunológicamente funcional del mismo). En algunas realizaciones, el antígeno tiene la capacidad de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a dicho antígeno. Un antígeno puede poseer uno o más epítopos que tienen la capacidad de interactuar con diferentes proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante capaz de unirse a una proteína de unión a antígeno, tal como un anticuerpo o un receptor de linfocitos T. Un epítopo es una región de un antígeno a la que se une una proteína de unión a antígeno que se dirige a dicho antígeno y cuando el antígeno es una proteína, incluye aminoácidos específicos que entran en contacto directamente con la proteína de unión a antígeno. Con mucha frecuencia, los epítopos residen en las proteínas, pero en algunos casos, pueden encontrarse en otros tipos de moléculas, tales como ácidos nucleicos. Los determinantes epitópicos pueden incluir agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. En general, los anticuerpos específicos para un antígeno diana particular reconocerán preferentemente un epítopo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que la especie de molécula descrita es la especie predominante presente, es decir, en una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la misma mezcla. En determinadas realizaciones, una molécula sustancialmente pura es una composición en donde la especie del

objeto comprende al menos un 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial, en donde no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales y por tanto, la composición consiste en una sola especie macromolecular detectable.

El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.

Como se usa en el presente documento, los términos "marcador" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotina que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En determinadas realizaciones, la etiqueta o el marcador también puede ser terapéutico. Se conocen y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítopo). En determinadas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

La expresión "muestra biológica", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o procedente de un ser vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero sin limitación, sangre, suero, orina, células, órganos, tejidos, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos y piel.

La expresión "composición de agente farmacéutico" (o agente o fármaco), como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto farmacéutico, composición, agente o fármaco capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. No requiere necesariamente más de un tipo de ingrediente.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de una proteína de unión a antígeno de PCSK9 determinada para producir una respuesta terapéutica en un mamífero. Dichas cantidades terapéuticamente eficaces se determinan fácilmente por un experto habitual en la materia.

El término "modulador", como se usa en el presente documento, es un compuesto que cambia o altera la actividad o función de una molécula. Por ejemplo, un modulador puede provocar un aumento o reducción en la magnitud de una cierta actividad o función de una molécula, en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En determinadas realizaciones, un modulador es un inhibidor, que reduce la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Ciertas actividades y funciones ejemplares de una molécula incluyen, pero sin limitación, afinidad de unión, actividad enzimática y transducción de señales. Ciertos inhibidores ejemplares incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, anticuerpos, pepticuerpos, carbohidratos o moléculas orgánicas pequeñas. Los pepticuerpos se describen en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.660.843 (correspondiente a la Solicitud PCT n.º WO 01/83525).

Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente e incluyen sujetos animales humanos y no humanos, así como aquellos con trastornos formalmente diagnosticados, aquellos con trastornos formalmente reconocidos, aquellos que reciben atención médica, aquellos en riesgo de desarrollar los trastornos, etc.

Los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen tratamientos terapéuticos, tratamientos profilácticos y aplicaciones en las que se reduce el riesgo de que un sujeto desarrolle un trastorno u otro factor de riesgo. El tratamiento no requiere la curación completa de un trastorno y abarca realizaciones en las que se reducen los síntomas o factores de riesgo subyacentes.

El término "prevenir" no requiere un 100 % de eliminación de la posibilidad de un evento. En cambio, indica que se ha reducido la probabilidad de que se produzca el evento en presencia del compuesto o el método.

Pueden usarse técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden llevarse a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se lleva a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden llevarse a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2.ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas en conexión con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica que se describen en el presente documento son los conocidos y comúnmente usados en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro y tratamiento de pacientes.

Proteínas de unión a antígeno dirigidas a PCSK9

La proproteína convertasa subtilisina quexina tipo 9 (PCSK9) es una serina proteasa implicada en la regulación de los niveles de la proteína de receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Horton *et al.,* 2007; Seidah y Prat, 2007). PCSK9 es una prohormona-proproteína convertasa de la familia subtilisina (S8) de serina proteasas (Seidah *et al.*, 2003). Se presenta una secuencia de aminoácidos de PCSK9 humana ejemplar como las SEQ ID NO: 1 y 3 en la FIG. 1A (que representa el "prodominio" de la proteína subrayado) y la FIG. 1B (que representa la secuencia de señal en negrita y el prodominio subrayado). Una secuencia codificante de PCSK9 humana ejemplar se presenta como la SEQ ID NO: 2 (FIG. 1B). Como se describe en el presente documento, las proteínas PCSK9 también pueden incluir fragmentos de la proteína PCSK9 de longitud completa. La estructura de la proteína PCSK9 se resolvió por dos grupos (Cunningham *et al.*, Nature Structural & Molecular Biology, 2007 y Piper *et al.*, Structure, 15:1-8, 2007). PCSK9 incluye una secuencia de señal, un prodominio N-terminal, un dominio catalítico de tipo subtilisina y un dominio C-terminal.

Las proteínas de unión a antígeno (ABP) que se unen a PCSK9, incluyendo PCSK9 humana, se proporcionan en el presente documento. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno proporcionadas son polipéptidos que comprenden una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), como se describe en el presente documento. En algunas proteínas de unión a antígeno, las CDR están incluidas en una región "marco", que orienta las CDR de tal forma que se logran las propiedades de unión a antígeno adecuadas de las CDR. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento pueden interferir con, bloquear, reducir o modular la interacción entre PCSK9 y LDLR. Dichas proteínas de unión a antígeno se indican como "neutralizantes". En algunas realizaciones, la unión entre PCSK9 y LDLR puede seguir produciéndose, incluso si la proteína de unión a antígeno es neutralizante y se une a PCSK9. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ABP previene o reduce la influencia adversa de PCSK9 sobre LDLR sin bloquear el sitio de unión a LDLR en PCSK9. Por tanto, en algunas realizaciones, la ABP modula o altera la capacidad de PCSK9 para dar como resultado la degradación del LDLR, sin tener que impedir la interacción de unión entre PCSK9 y LDLR. Dichas ABP pueden describirse específicamente como ABP "neutralizantes de manera no competitiva". En algunas realizaciones, la ABP neutralizante se une a PCSK9 en una ubicación y/o de un modo que impide la unión de PCSK9 a LDLR. Dichas ABP pueden describirse específicamente como ABP "neutralizantes de manera competitiva". Los dos neutralizantes anteriores pueden dar como resultado que haya presente una mayor cantidad de LDLR en un sujeto, lo que da como resultado mayor unión de LDLR a LDL (reduciendo de este modo la cantidad de LDL en el sujeto). A su vez, esto da como resultado una reducción en la cantidad de colesterol sérico presente en un sujeto.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento son capaces de inhibir la actividad mediada por PCSK9 (incluyendo la unión). En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno que se unen a estos epítopos inhiben, entre otras cosas, las interacciones entre PCSK9 y LDLR y otros efectos fisiológicos mediados por PCSK9. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno son humanas, tales como anticuerpos completamente humanos dirigidos contra PCSK9.

En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une a la forma madura de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une al prodominio de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une selectivamente a la forma madura de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico de un modo tal que PCSK9 no puede unirse o unirse con la misma eficacia a LDLR. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno no se une al extremo C-terminal del dominio catalítico. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno no se une al extremo N-terminal del dominio catalítico. En algunas realizaciones, la ABP no se une al extremo N o C-terminal de la proteína PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une a uno cualquiera de los epítopos a los que se unen los anticuerpos analizados en el presente documento. En algunas realizaciones, esto puede determinarse mediante ensayos de competición entre los anticuerpos divulgados en el presente documento y otros anticuerpos. En algunas realizaciones, la ABP se une a un epítopo al que se une uno de los anticuerpos descritos en la tabla 2. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se unen a un estado conformacional específico de PCSK9 a fin de prevenir la interacción de PCSK9 con LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio V de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio V de PCSK9 e impide (o reduce) la unión de PCSK9 a LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio V de PCSK9 y aunque no impide (o reduce) la unión de PCSK9 a LDLR, la ABP previene o reduce las actividades adversas mediadas por PCSK9 sobre el LDLR.

Las proteínas de unión a antígeno que se divulgan en el presente documento tienen una variedad de utilidades. Algunas de las proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, son útiles en ensayos de unión específicos, purificación por afinidad de PCSK9, en particular PCSK9 humana o sus ligandos y en ensayos de detección sistemática para identificar otros antagonistas de la actividad de PCSK9. Algunas de las proteínas de unión a antígeno son útiles para inhibir la unión de PCSK9 a LDLR o para inhibir actividades mediadas por PCSK9.

Las proteínas de unión a antígeno pueden usarse en una variedad de aplicaciones terapéuticas, como se explica en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 son útiles para tratar afecciones asociadas con PCSK9, tales como trastornos relacionados con el colesterol (o "trastornos relacionados con el colesterol sérico"), tales como hipercolesterolemia, como se describe adicionalmente en el presente documento. Otros usos para las proteínas de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, el diagnóstico de enfermedades o afecciones relacionadas con PCSK9 y ensayos de detección sistemática para determinar la presencia

o ausencia de PCSK9. Algunas de las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento son útiles para tratar las consecuencias, los síntomas y/o las patologías asociadas con la actividad de PCSK9.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan comprenden una o más CDR (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una estructura de polipéptido y (b) una o más CDR que se insertan en y/o se unen a la estructura de polipéptido. La estructura de polipéptido puede adoptar una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, puede ser o comprender, la estructura de un anticuerpo de origen natural o un fragmento o variante del mismo o puede ser de naturaleza completamente sintética. Se describen adicionalmente más adelante ejemplos de diversas estructuras de polipéptido.

En determinadas realizaciones, la estructura de polipéptido de las proteínas de unión a antígeno es un anticuerpo o procede de un anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (en ocasiones citados en el presente documento como "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpo (en ocasiones citadas como "conjugados de anticuerpo") y porciones o fragmentos de cada uno, respectivamente. En algunos casos, la proteína de unión a antígeno es un fragmento inmunológico de un anticuerpo (por ejemplo, un Fab, un Fab', un $F(ab')_2$ o un scFv). Las diversas estructuras se describen adicionalmente y se definen en el presente documento.

Algunas de las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en el presente documento se unen específica y/o selectivamente a PCSK9 humana. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une específicamente y/o selectivamente a la proteína PCSK9 humana que tiene y/o que consiste en los restos 153-692 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la ABP se une específica y/o selectivamente a PCSK9 humana que tiene y/o consiste en los restos 31-152 de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la ABP se une selectivamente a la proteína PCSK9 humana como se representa en la FIG. 1A (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une específicamente a al menos un fragmento de la proteína PCSK9 y/o a una proteína PCSK9 de longitud completa, con o sin una secuencia de señal.

En realizaciones en las que se usa la proteína de unión a antígeno para aplicaciones terapéuticas, una proteína de unión a antígeno puede inhibir, interferir con o modular una o más actividades biológicas de PCSK9. En una realización, una proteína de unión a antígeno se une específicamente a PCSK9 humana y/o inhibe sustancialmente la unión de PCSK9 humana a LDLR en al menos aproximadamente un 20 %-40 %, 40-60 %, 60-80 %, 80-85 % o más (por ejemplo, midiendo la unión en un ensayo de unión competitiva *in vitro*). Algunas de las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan en el presente documento son anticuerpos. En algunas realizaciones, la ABP tiene una K_d de menos (se une más estrechamente) de 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} M. En algunas realizaciones, la ABP tiene una CI_{50} para el bloqueo de la unión de LDLR a PCSK9 (D374Y, variedad de alta afinidad) de menos de 1 microM, de 1000 nM a 100 nM, de 100 nM a 10 nM, de 10 nM a 1 nM, 1000 pM a 500 pM, de 500 pM a 200 pM, menor de 200 pM, de 200 pM a 150 pM, de 200 pM a 100 pM, de 100 pM a 10 pM, de 10 pM a 1 pM.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena pesada de IgG2 de un anticuerpo anti-PCSK9 de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 154, FIG. 3KK.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena pesada de IgG4 de un anticuerpo anti-PCSK9 de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 155, FIG. 3KK.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena ligera kappa de un anticuerpo anti-PCSK9 tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 157, FIG. 3KK.

Un ejemplo de un dominio constante de cadena ligera lambda de un anticuerpo anti-PCSK9 tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 156, FIG. 3KK.

Las regiones variables de cadenas de inmunoglobulina muestran normalmente la misma estructura general, que comprende regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, más comúnmente denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par de cadena pesada/cadena ligera mencionadas anteriormente se alinean normalmente por las regiones marco para formar una estructura que se une específicamente a un epítopo específico en la proteína diana (por ejemplo, PCSK9). De N-terminal a C-terminal, las regiones variables de cadena ligera y pesada de origen natural se conforman ambas normalmente con el siguiente orden de estos elementos: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Se ha diseñado un sistema de numeración para asignar números a los aminoácidos que ocupan posiciones en cada uno de estos dominios. Este sistema de numeración se define en Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 y 1991, NIH, Bethesda, MD) o Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, Nature 342:878-883.

En el presente documento se proporcionan diversas regiones variables de cadena pesada y ligera y se representan en las FIG. 2A-3JJ y 3LL-3BBB. En algunas realizaciones, puede unirse cada una de estas regiones variables a las regiones constantes de cadena pesada y ligera anteriores para formar una cadena pesada y ligera de anticuerpo completa, respectivamente. Además, cada una de las secuencias de cadena pesada y ligera generadas de este modo

puede combinarse para formar una estructura de anticuerpo completa.

Los ejemplos específicos de algunas de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos que se proporcionan y sus secuencias de aminoácidos correspondientes se resumen en la TABLA 2.

TABLA 2: Regiones variables de cadena pesada y ligera ejemplares

Anticuerpo	**SEQ ID NO ligera/pesada**
30A4	5/74
3C4	7/85
23B5	9/71
25G4	10/72
31H4	12/67
27B2	13/87
25A7	15/58
27H5	16/52
26H5	17/51
31D1	18/53
20D10	19/48
27E7	20/54
30B9	21/55
19H9	22/56
26E10	23/49
21B12	23/49
17C2	24/57
23G1	26/50
13H1	28/91
9C9	30/64
9H6	31/62
31A4	32/89
1A12	33/65
16F12	35/79
22E2	36/80
27A6	37/76
28B12	38/77
28D6	39/78
31G11	40/83
13B5	42/69
31B12	44/81
3B6	46/60

(continuación)

Anticuerpo	SEQ ID NO ligera/pesada
5H5	421/419
24F7	425/423
22B11	429/427
30F1	433/431
24B9.1	437/435
24B9.2	441/439
20A5.1	445/443
20A5.2	449/447
20E5.1	453/451
20E5.2	457/455
8A3	461/459
11F1	465/463
12H11	469/467
11H4	473/471
11H8	477/475
11G1	481/479
8A1	485/483

De nuevo, puede combinarse cada una de las cadenas pesadas variables ejemplares listadas en la tabla 2 con cualquiera de las cadenas ligeras variables ejemplares mostradas en la tabla 2 para formar un anticuerpo. La tabla 2 muestra emparejamientos de cadena ligera y pesada hallados en varios de los anticuerpos divulgados en el presente documento. En algunos casos, los anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada variable y una cadena ligera variable de las listadas en la tabla 2. En otros casos, los anticuerpos contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. A modo de ejemplo, un anticuerpo o proteína de unión a antígeno puede incluir una cadena pesada y una cadena ligera, dos cadenas pesadas o dos cadenas ligeras. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende (y/o consiste) en 1, 2 y/o 3 CDR de cadena pesada y/o ligera de al menos una de las secuencias listadas en la tabla 2 (las CDR para las secuencias se indican en las FIG. 2A-3D y otras realizaciones en las FIG. 3CCC-3JJJ y 15A-15D). En algunas realizaciones, las 6 CDR (CDR1-3 de la cadena ligera (CDRL1, CDRL2, CDRL3) y CDR1-3 de la cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3)) forman parte de la ABP. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5 o más CDR se incluyen en la ABP. En algunas realizaciones, se incluye en la ABP una CDR de cadena pesada y una de cadena ligera de las CDR en las secuencias en la tabla 2 (las CDR de las secuencias en la tabla 2 se indican en las FIG. 2A-3D). En algunas realizaciones, también se incluyen en la ABP secciones adicionales (por ejemplo, como se ilustra en las FIG. 2A-2D, 3A-3D y otras realizaciones en 3CCC-3JJJ y 15A-15D). Los ejemplos de CDR y FR para las cadenas pesadas y ligeras anotadas en la tabla 2 se indican en las FIG. 2A-3D (y otras realizaciones en las FIG. 3CCC-3JJJ y 15A-15D). Las secuencias variables de cadena ligera opcionales (que incluyen CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y FR4) pueden seleccionarse entre las siguientes: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 421, 425, 429, 433, 437, 441, 445, 449, 453, 457, 461, 465, 469, 473, 477, 481 y 485. Las secuencias variables de cadena pesada opcionales (que incluyen CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y FR4) pueden seleccionarse entre las siguientes: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81,60, 419, 423, 427, 431, 435, 439, 443, 447, 451, 455, 459, 463, 467, 471, 475, 479 y 483. EN algunas de las entradas en las FIG. 2A-3D, se identifican variaciones de las secuencias o límites alternativos de las CDR y FR. Estas alternativas se identifican con un "v1" después del nombre de la ABP. Ya que la mayoría de estas alternativas son de una naturaleza menor, solo se presentan en la tabla las secciones con diferencias. Se entiende que la sección restante de las cadenas ligeras o pesadas es igual a la mostrada para la ABP básica en los otros paneles. Por tanto, por ejemplo, 19H9v1 en la FIG. 2C tiene las mismas FR1, CDR1 y FR2 que 19H9 en la FIG. 2A ya que la única diferencia se indica en la FIG. 2C. Para tres de las secuencias de ácido nucleico (ABP 26E10, 30B9 y 31B12), se proporcionan en las figuras secuencias de ácido nucleico adicionales alternativas. Como apreciará un experto en la materia, no es de hecho necesario usar más de una de dichas secuencias en la creación de un anticuerpo o una ABP. De hecho, en algunas realizaciones, es necesaria la presencia de solo uno o ninguno de los ácidos nucleicos de cadena pesada o ligera específicos.

En algunas realizaciones, la ABP está codificada por una secuencia de ácido nucleico que puede codificar cualquiera de las secuencias de proteína en la tabla 2.

En algunas realizaciones, la ABP se une selectivamente a la forma de PCSK9 que se une a LDLR (por ejemplo, la forma autocatalizada de la molécula). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno no se une al extremo C-terminal del dominio catalítico (por ejemplo, los 5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40 aminoácidos más próximos al extremo C-terminal). En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno no se une al extremo N-terminal del dominio catalítico (por ejemplo, los 5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40 aminoácidos más próximos al extremo N-terminal). En algunas realizaciones, la ABP se une a aminoácidos entre los aminoácidos 1-100 de la forma madura de PCSK9. En algunas realizaciones, la ABP se une a aminoácidos entre (y/o secuencias de aminoácidos que consisten en) los aminoácidos 31-100, 100-200, 31-152, 153-692, 200-300, 300-400, 452-683, 400-500, 500-600, 31-692, 31-449 y/o 600-692. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico. En algunas realizaciones, la ABP neutralizante y/o no neutralizante se une al prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une tanto al dominio catalítico como al prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico a fin de obstruir un área en el dominio catalítico que interactúa con el prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico en una ubicación o superficie con la que interactúa el prodominio, como se explica en Piper *et al.* (Structure 15:1-8 (2007), incluyendo las representaciones estructurales en el mismo). En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico y restringe la movilidad del prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico sin unirse al prodominio. En algunas realizaciones, la ABP se une al dominio catalítico, sin unirse al prodominio, a la vez que impide que se reoriente el prodominio para permitir la unión de PCSK9 a LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une al mismo epítopo que aquellas que rodean los restos 149-152 del prodominio en Piper *et al.* En algunas realizaciones, las ABP se unen al surco (como se indica en Piper *et al.)* en el dominio V. En algunas realizaciones, las ABP se unen a un tramo rico en histidina próximo al surco en el dominio V. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos (que se unen al dominio V) no son neutralizantes. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen al dominio V son neutralizantes. En algunas realizaciones, las ABP neutralizantes impiden la unión de PCSK9 a LDLR. En algunas realizaciones, las ABP neutralizantes, aunque impiden la degradación por PCSK9 de LDLR, no impiden la unión de PCSK9 a LDLR (por ejemplo, la ABP 31A4). En algunas realizaciones, la ABP se une a o bloquea al menos una de las histidinas representadas en la figura 4 del artículo de Piper *et al.* En algunas realizaciones, la ABP bloquea la tríada catalítica en PCSK9.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une de manera selectiva a proteínas PCSK9 variantes, por ejemplo, D374Y frente a PCSK9 de tipo silvestre. En algunas realizaciones, estos anticuerpos se unirán a la variante con una fuerza al menos dos veces mayor que al tipo silvestre y preferentemente, 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000, 1000-10.000 o más al mutante que al tipo silvestre (como se mide mediante la K_d). En algunas realizaciones, el anticuerpo inhibe de manera selectiva la interacción de la variante de PCSK9 D374Y con LDLR frente a la capacidad de PCSK9 de tipo silvestre para interactuar con LDLR. En algunas realizaciones, estos anticuerpos bloquean la capacidad de la variante para unirse a LDLR con más fuerza que la capacidad del tipo silvestre, por ejemplo, con una fuerza al menos dos veces mayor que el tipo silvestre y preferentemente, 2-5, 5-10, 10-100, 100-1000 veces o más al mutante que al tipo silvestre (medida mediante una CI_{50}). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a y neutraliza tanto PCSK9 de tipo silvestre como formas variantes de PCSK9, tales como D374Y a niveles similares. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a PCSK9 para impedir que las variantes de LDLR se unan a PCSK9. En algunas realizaciones, las variantes de LDLR son al menos un 50 % idénticas a LDLR humano. Obsérvese que los expertos en la materia conocen variantes de LDLR (por ejemplo, Brown MS et al., "Calcium cages, acid baths and recycling receptors" Nature 388: 629-630, 1997). En algunas realizaciones, la ABP puede aumentar el nivel de LDLR eficaz en la hipercolesterolemia heterocigótica familiar (donde hay presencia de una variante de pérdida de función de LDLR).

En algunas realizaciones, la ABP se une a (pero no bloquea) variantes de PCSK9 que tienen al menos un 50 %, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o un mayor porcentaje de identidad respecto de la forma de PCSK9 representada en la FIG. 1A y/o la FIG. 1B. En algunas realizaciones, la ABP se une a (pero no bloquea) variantes de PCSK9 que tienen al menos un 50 %, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o un mayor porcentaje de identidad respecto de la forma madura de PCSK9 representada en la FIG. 1A y/o la FIG. 1B. En algunas realizaciones, la ABP se une a e impide que las variantes de PCSK9 que tienen al menos un 50 %, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o un mayor porcentaje de identidad respecto de la forma de PCSK9 representada en la FIG. 1A y/o la FIG 1B interactúen con LDLR. En algunas realizaciones, la ABP se une a e impide que las variantes de PCSK9 que tienen al menos un 50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-95, 95-99 o un mayor porcentaje de identidad respecto de la forma madura de PCSK9 representada en la FIG. 1B interactúen con LDLR. En algunas realizaciones, la variante de PCSK9 es una variante humana, tal como variantes en la posición 474, E620G y/o E670G. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 474 es valina (como en otros seres humanos) o treonina (como en monos cinomolgos y ratones). Dados los datos de reactividad cruzada presentados en el presente documento, se cree que los presentes anticuerpos se unirán fácilmente a las variantes anteriores.

En algunas realizaciones, la ABP se une a un epítopo al que se une uno de los anticuerpos descritos en la tabla 2. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se unen a un estado conformacional específico de PCSK9 a fin de prevenir la interacción de PCSK9 con LDLR.

Proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) humanizadas

Como se describe en el presente documento, una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 puede comprender un anticuerpo humanizado y/o una parte del mismo. Una aplicación práctica importante de dicha estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratones.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado es sustancialmente no inmunogénico en seres humanos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado tiene sustancialmente la misma afinidad por una diana que un anticuerpo de otra especie de la que procede el anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5.530.101, la Patente de los Estados Unidos 5.693.761; la Patente de los Estados Unidos 5.693.762; la Patente de los Estados Unidos 5.585.089.

En determinadas realizaciones, se identifican aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo que pueden modificarse sin reducir la afinidad nativa del dominio de unión a antígeno a la vez que se reduce su inmunogenicidad. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.766.886 y 5.869.619.

En determinadas realizaciones, se diseña la modificación de un anticuerpo mediante métodos conocidos en la técnica para lograr una afinidad de unión aumentada por una diana y/o para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo en el receptor. En determinadas realizaciones, los anticuerpos humanizados se modifican para eliminar los sitos de glucosilación a fin de aumentar la afinidad del anticuerpo por su antígeno afín. Véase, por ejemplo, Co *et al.*, Mol. Immunol., 30:1361-1367 (1993). En determinadas realizaciones, se usan técnicas tales como la "reformación", "hiperquimerización" o "chapado/modificación de la superficie" para producir anticuerpos humanizados. Véase, por ejemplo, Vaswami *et al.*, Annals of Allergy, Asthma, & Immunol. 81:105 (1998); Roguska *et al.*, Prot. Engineer., 9:895-904 (1996); y la Patente de los Estados Unidos n.º 6.072.035. En determinadas realizaciones similares, dichas técnicas normalmente reducen la inmunogenicidad del anticuerpo reduciendo el número de restos extraños, pero no impiden las respuestas antiidiotípicas y antialotípicas después de la administración repetida de los anticuerpos. Se describen algunos métodos diferentes para reducir la inmunogenicidad, por ejemplo, en Gilliland *et al.*, J. Immunol., 62(6): 3663-71 (1999).

En determinados casos, la humanización de anticuerpos da como resultado una pérdida de la capacidad de unión al antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos humanizados se "retromutan". En determinadas realizaciones similares, se muta el anticuerpo humanizado para incluir uno o más de los restos de aminoácido hallados en el anticuerpo donante. Véase, por ejemplo, Saldanha *et al.*, Mol Immunol 36:709-19 (1999).

En ciertas realizaciones, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo dirigido contra PCSK9 pueden injertarse en regiones marco (FR) de la misma u otra especie. En determinadas realizaciones, las CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo dirigido contra PCSK9 pueden injertarse en FR humanas consenso. Para crear FR consenso humanas, en ciertas realizaciones, se alinean FR de varias secuencias de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera humana para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. En determinadas realizaciones, se reemplazan las FR de la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo dirigido contra PCSK9 con las FR de una cadena ligera o una cadena pesada diferente. En determinadas realizaciones, no se reemplazan aminoácidos raros en las FR de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo dirigido contra PCSK9, mientras que se reemplaza el resto de los aminoácidos de la FR. Los aminoácidos raros son aminoácidos específicos que se encuentran en posiciones en las que normalmente no se encuentran en las FR. En determinadas realizaciones, pueden usarse las regiones variables injertadas de un anticuerpo dirigido contra PCSK9 con una región constante que es diferente de la región constante de un anticuerpo dirigido contra PCSK9. En determinadas realizaciones, las regiones variables injertadas forman parte de un anticuerpo Fv monocatenario. El injerto de CDR se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.180.370, 6.054.297, 5.693.762, 5.859.205, 5.693.761, 5.565.332, 5.585.089 y 5.530.101 y en Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science., 239:1534-1536 (1988), Winter, FEBS Letts., 430:92-94 (1998).

Proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) humanas

Como se describe en el presente documento, una proteína de unión a antígeno que se une a PCSK9 puede comprender un anticuerpo humano (es decir, completamente humano) y/o una parte del mismo. En determinadas realizaciones, se proporcionan secuencias de nucleótidos que codifican y secuencias de aminoácidos que comprenden moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera, en particular, secuencias correspondientes a las regiones variables. En determinadas realizaciones, se proporcionan secuencias correspondientes a regiones determinantes de la complementariedad (CDR), específicamente de CDR1 a CDR3. De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona una línea celular de hibridoma que expresa dicha molécula de inmunoglobulina. De acuerdo con ciertas realizaciones, se proporciona una línea celular de hibridoma que expresa dicho anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, se selecciona una línea celular de hibridoma de al menos una de las líneas celulares descritas en la tabla 2, por ejemplo, 21B12, 16F12 y 31H4. En determinadas realizaciones, se proporciona un anticuerpo monoclonal humano purificado dirigido contra PCSK9.

Se pueden modificar por ingeniería genética estirpes de ratón deficientes para la producción de anticuerpos de ratón

con grandes fragmentos de los loci de Ig humana previendo que dichos ratones podrían producir anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humana pueden preservar la gran diversidad génica variable así como la regulación adecuada de la producción y expresión de anticuerpo. Al aprovechar la maquinaria de ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la ausencia de tolerancia inmunológica contra proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducido en estas estirpes de ratón puede producir anticuerpos completamente humanos de alta afinidad dirigidos contra cualquier antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse mAb humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada. Se describen ciertos métodos ejemplares en el documento WO 98/24893, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.545.807, el documento EP 546073 y el documento EP 546073.

En determinadas realizaciones, se pueden usar regiones constantes de especies distintas de la humana junto con las regiones variables humanas.

La capacidad para clonar y reconstruir loci humanos con tamaños en el orden de megabases en cromosomas artificiales de levadura (YAC) y para introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona una estrategia para dilucidar los componentes funcionales de loci muy grandes o vagamente mapeados, así como para generar modelos útiles de enfermedades humanas. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón por sus equivalentes humanos podría dar una idea acerca de la expresión y regulación de productos génicos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su implicación en la inducción y progresión de enfermedades.

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que tienen las regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de dichas proteínas de origen murino o de rata puede ocasionar la rápida eliminación de los anticuerpos o puede ocasionar la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por parte de un paciente. A fin de evitar la utilización de anticuerpos de origen murino o de rata, pueden generarse anticuerpos completamente humanos mediante la introducción de loci de anticuerpo humano funcionales en un roedor, otro mamífero o un animal, de tal forma que el roedor, el otro mamífero o el animal produce anticuerpos completamente humanos.

Los anticuerpos humanizados son aquellos anticuerpos que, aunque inicialmente contienen secuencias de aminoácidos de anticuerpo que no son humanas, sufren el reemplazo de al menos algunas de estas secuencias de aminoácidos de anticuerpo no humanas por secuencias de anticuerpo humanas. Esto contrasta con los anticuerpos humanos, en los que el anticuerpo está codificado (o puede estar codificado) por genes poseídos por un ser humano.

Variantes de la proteína de unión a antígeno

Otros anticuerpos que se proporcionan son variantes de las ABP listadas anteriormente, formadas mediante la combinación de subpartes de las cadenas pesadas variables y ligeras variables mostradas en la tabla 2 y comprenden cadenas ligeras variables y/o pesadas variables que tienen cada una al menos un 50 %, 50-60, 60-70, 70-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-97 %, 97-99 % o más de un 99 % de identidad respecto de las secuencias de aminoácidos de las secuencias en la tabla 2 (ya sea la secuencia completa o una subparte de la secuencia, por ejemplo, una o más CDR). En algunos casos, dichos anticuerpos incluyen al menos una cadena pesada y una cadena ligera, mientras que en otros casos, las formas variantes contienen dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas (o subpartes de las mismas). En algunas realizaciones, puede usarse la comparación de secuencias en la FIG. 2A-3D (y 13A-13J y otras realizaciones en 15A-15D) para identificar secciones de los anticuerpos que pueden modificarse observando aquellas variaciones que tienen impacto en la unión y aquellas variaciones que no parecen tener impacto en la unión. Por ejemplo, al comparar secuencias similares, se pueden identificar aquellas secciones (por ejemplo, aminoácidos particulares) que pueden modificarse y cómo pueden modificarse mientras que siguen conservando (o mejorando) la funcionalidad de la ABP. En algunas realizaciones, las variantes de las ABP incluyen aquellos grupos y secuencias consenso ilustrados en las FIG. 13A, 13C, 13F, 13G, 13H, 13J y/o 13J y se permiten variaciones en las posiciones identificadas como variables en las figuras. Las CDR mostradas en las FIG. 13A, 13C, 13F y 13G se definieron basándose en una combinación híbrida del método de Chothia (basado en la ubicación de las regiones de bule estructural, véase, por ejemplo, "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Bissan Al-Lazikani, Arthur M. Lesk y Cyrus Chothia, Journal of Molecular Biology, 273(4): 927-948, 7 de noviembre (1997)) y el método de Kabat (basado en la variabilidad de secuencia, véase, por ejemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición. Publicación de NIH n.º 91-3242, Kabat *et al.*, (1991)). Cada resto determinado mediante cualquiera de los dos métodos, se incluyó en la lista final de restos de CDR (y se presenta en las FIG. 13A, 13C, 13F y 13G). Las CDR en las FIG. 13H, 13I y 13J se obtuvieron únicamente mediante el método de Kabat. A menos que se especifique otra cosa, las secuencias consenso, las CDR y las FR definidas en las FIG. 13H-13J definirán y regirán las CDR y FR anotadas para las ABP citadas en la FIG. 13.

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre al

menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una cadena pesada que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a una o más CDR de las CDR en al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En algunas realizaciones, están presentes 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR (siendo cada una al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a una o más FR de las FR en al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 74, 85, 71, 72, 67, 87, 58, 52, 51, 53, 48, 54, 55, 56, 49, 57, 50, 91, 64, 62, 89, 65, 79, 80, 76, 77, 78, 83, 69, 81 y 60. En algunas realizaciones, están presentes 1, 2, 3 o 4 FR (siendo cada una al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno comprende una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada entre al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a una o más CDR de las CDR en al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En algunas realizaciones, están presentes 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR (siendo cada una al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia que es al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a una o más FR de las FR en al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 5, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 y 46. En algunas realizaciones, están presentes 1, 2, 3 o 4 FR (siendo cada una al menos un 90 %, 90-95 % y/o 95-99 % idéntica a las secuencias anteriores).

A la luz de la presente divulgación, un experto en la materia será capaz de determinar variantes adecuadas de las ABP como se exponen en el presente documento usando técnicas bien conocidas. En determinadas realizaciones, un experto en la materia puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad por regiones de direccionamiento que no se consideran importantes para la actividad. En determinadas realizaciones, pueden identificarse restos y porciones de las moléculas que se encuentran conservados entre polipéptidos similares. En determinadas realizaciones, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

Además, un experto en la materia puede revisar estudios de estructura-función que identifiquen restos en polipéptidos similares que sean importantes para la actividad o la estructura. En vista de dicha comparación, se puede predecir la importancia de los restos de aminoácido en una proteína que corresponden a restos de aminoácido que son importantes para la actividad o la estructura de proteínas similares. Un experto en la materia puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos restos de aminoácido importantes predichos.

Un experto en la materia también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con dicha estructura en ABP similares. En vista de dicha información, un experto en la materia puede predecir el alineamiento de restos de aminoácido de un anticuerpo con respecto a su estructura tridimensional. En determinadas realizaciones, un experto en la materia puede elegir no hacer cambios radicales en los restos de aminoácido que se predice que se encuentran en la superficie de la proteína, debido a que dichos restos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la materia puede generar variantes de ensayo que contienen una sola sustitución de aminoácido en cada resto de aminoácido deseado. Las variantes pueden explorarse usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la materia. Dichas variantes pueden usarse

para obtener información acerca de variantes adecuadas. Por ejemplo, en caso de descubrirse que un cambio en un resto de aminoácido particular da como resultado una actividad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, pueden evitarse variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información obtenida de dichos experimentos rutinarios, un experto en la materia puede determinar fácilmente los aminoácidos donde han de evitarse sustituciones adicionales, ya sean solos o en combinación con otras mutaciones.

Se ha dedicado una serie de publicaciones científicas a la predicción de la estructura secundaria. Véase Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4):422-427 (1996), Chou *et al.*, Biochemistry, 13(2):222-245 (1974); Chou *et al.*, Biochemistry, 113(2):211-222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou *et al.*, Biophys. J., 26:367-384 (1979). Además, en la actualidad se encuentran disponibles programas informáticos para ayudar a predecir la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tengan una identidad de secuencia mayor del 30 % o una similitud mayor del 40 %, normalmente tienen topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructural de proteína (PDB) ha proporcionado una capacidad de predicción mejorada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues en la estructura de un polipéptido o una proteína. Véase Holm *et al.*, Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376 (1997)) que hay un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína determinado y que una vez que se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá drásticamente más precisa.

Los métodos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen el "reconocimiento del plegamiento" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3):377-87 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4(1):15-19 (1996)), "análisis de perfiles" (Bowie *et al.*, Science, 253:164-170 (1991); Gribskov *et al.*, Meth. Enzym., 183:146-159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84(13):4355-4358 (1987)) y "ligamiento evolutivo" (véase Holm, anteriormente citado (1999) y Brenner, anteriormente citado (1997)).

En determinadas realizaciones, las variantes de la proteína de unión a antígeno incluyen variantes de glucosilación, en donde se ha alterado el número y/o el tipo de sitios de glucosilación en comparación con las secuencias de aminoácidos de un polipéptido precursor. En determinadas realizaciones, las variantes de proteína comprenden un mayor o menor número de sitios de glucosilación ligada a N que la proteína nativa. Un sitio de glucosilación ligada a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde el resto de aminoácido indicado como X puede ser cualquier resto de aminoácido excepto prolina. La sustitución de restos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de carbohidrato ligada a N. Como alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia retirarán una cadena de carbohidrato ligada a N existente. También se proporciona un reordenamiento de cadenas de carbohidrato ligadas a N en donde se eliminan uno o más sitios de glucosilación ligados a N (normalmente aquellos que son de origen natural) y se crean uno o más nuevos sitios ligados a N. Las variantes de anticuerpo preferida adicionales incluyen variantes de cisteína en donde se eliminan o sustituyen uno o más restos de cisteína por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos precursora. Las variantes de cisteína pueden ser útiles cuando los anticuerpos han de replegarse en una conformación biológicamente activa, tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína generalmente tienen menos restos de cisteína que la proteína nativa y normalmente, tienen un número par para minimizar las interacciones resultantes de las cisteínas no emparejadas.

De acuerdo con ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteína, (4) alteran las afinidades de unión y/o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales en dichos polipéptidos. De acuerdo con ciertas realizaciones, pueden efectuarse sustituciones de aminoácidos (en ciertas realizaciones, sustituciones de aminoácidos conservativas) individuales o múltiples en la secuencia de origen natural (en ciertas realizaciones, en la porción del polipéptido fuera de los dominios que forman contactos intermoleculares). En determinadas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa normalmente puede no cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia precursora (por ejemplo, un reemplazo de aminoácidos no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia precursora o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia precursora). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.*, Nature, 354:105 (1991).

En algunas realizaciones, las variantes son variantes de las secuencias de ácido nucleico de las ABP divulgadas en el presente documento. Un experto en la materia apreciará que el análisis anterior puede usarse para identificar, evaluar y/o crear variantes de proteína ABP y también para secuencias de ácido nucleico que pueden codificar dichas variantes de proteína. Por tanto, se contemplan secuencias de ácido nucleico que codifican dichas variantes de proteínas (así como secuencias de ácido nucleico que codifican las ABP en la tabla 2, pero son diferentes de aquellas explícitamente divulgadas en el presente documento). Por ejemplo, una variante de ABP puede tener al menos un 80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-97, 97-99 o más identidad respecto de al menos una secuencia de ácido nucleico descrita en las SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134,

135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151 o al menos de una a seis (y diversas combinaciones de las mismas) de las CDR codificadas por las secuencias de ácido nucleico en las SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151.

En algunas realizaciones, el anticuerpo (o la secuencia de ácido nucleico que lo codifica) es una variante en caso de que la secuencia de ácido nucleico que codifica la ABP particular (o la secuencia de ácido nucleico en sí) puede hibridar de manera selectiva con cualquiera de las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas en la tabla 2 (tal como, pero sin limitación, las SEQ ID NO: 152, 153, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151) en condiciones rigurosas. En una realización, las condiciones moderadamente rigurosas adecuadas incluyen prelavado en una solución de 5XSSC; SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C, -65 °C, 5xSSC, durante una noche o, en caso de homología entre especies cruzadas, a 45 °C con 0,5xSSC; seguido de lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de 2x, 0,5x y 0,2xSSC que contiene SDS al 0,1 %. Dichas secuencias de ADN hibridantes también se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación, al igual que las secuencias de nucleótidos que, debido a la degeneración del código, codifican un polipéptido de anticuerpo que está codificado por una secuencia de ADN hibridante y las secuencias de aminoácidos que están codificadas por estas secuencias de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las variantes de las CDR incluyen secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos codificadas por estas secuencias, que hibridan con una o más CDR en las secuencias indicadas anteriormente (las CDR individuales pueden determinarse fácilmente a la luz de las FIG. 2A-3D y otras realizaciones en las FIG. 3CCC-3JJJ y 15A-15D). La frase "hibridar de manera selectiva" citada en este contexto significa unirse de manera detectable y selectiva. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la divulgación hibridan de manera selectiva con hebras de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectivas, como se conoce en la técnica y se analiza en el presente documento. En general, la homología de secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de la divulgación y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos un 80 % y más típicamente, con homologías preferentemente crecientes de al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 99 % y 100 %. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas en caso de que haya una identidad completa o parcial entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85 % significa que un 85 % de los aminoácidos son idénticos cuando se alinean las dos secuencias para máxima coincidencia. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se estén emparejando) a la hora de maximizar el emparejamiento; se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos, siendo más preferidas las de 2 o menos. Como alternativa y preferentemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptido procedentes de estas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, en el sentido en que se usa este término, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación típica) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de puntuación y una penalización por hueco de 6 o más. Véase Dayhoff, M. O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y suplemento 2 de este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferentemente homólogas en caso de que sus aminoácidos tengan una identidad del 50 % o más cuando se alinean de manera óptima en el programa ALIGN. La expresión "corresponde a" se usa en el presente documento para hacer referencia a que una secuencia de polinucleótido es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a la totalidad o una porción de una secuencia de polinucleótido de referencia o que una secuencia de polinucleótido es idéntica a una secuencia de polinucleótido de referencia. En contraposición, la expresión "complementaria a" se usa en el presente documento para indicar que la secuencia complementaria es homóloga a la totalidad o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. A modo ilustrativo, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Preparación de proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos)

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno (tales como anticuerpos) se producen mediante inmunización con un antígeno (por ejemplo, PCSK9). En determinadas realizaciones, pueden producirse anticuerpos mediante inmunización con PCSK9 de longitud completa, una forma soluble de PCSK9, solo el dominio catalítico, la forma madura de PCSK9 mostrada en la FIG. 1A, una variante de corte y empalme de PCSK9 o un fragmento de la misma. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención son monoclonales y/o pueden ser anticuerpos recombinantes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos humanos preparados, por ejemplo, mediante inmunización de animales transgénicos capaces de producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la Solicitud PCT Publicada n.º WO 93/12227).

En determinadas realizaciones, pueden emplearse ciertas estrategias para manipular las propiedades inherentes de un anticuerpo, tales como la afinidad de un anticuerpo por su diana. Dichas estrategias incluyen, pero sin limitación, el uso de mutagénesis de sitio específico o aleatoria de la molécula de polinucleótido que codifica un anticuerpo para generar una variante de anticuerpo. En determinadas realizaciones, dicha generación va seguida de detección sistemática de variantes de anticuerpo que muestran el cambio deseado, por ejemplo, afinidad aumentada o reducida.

En determinadas realizaciones, los restos de aminoácido diana en las estrategias de mutagénesis son aquellos en las CDR. En determinadas realizaciones, se usan como diana los aminoácidos en las regiones marco de los dominios variables. En determinadas realizaciones, se ha demostrado que dichas regiones marco contribuyen a las propiedades de unión a la diana de ciertos anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hudson, Curr. Opin. Biotech., 9:395-402 (1999) y las referencias en el mismo.

En determinadas realizaciones, se producen catálogos de variantes de anticuerpo más pequeños y más fáciles de detectar sistemáticamente restringiendo la mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio a los sitios de hipermutación en las CDR, que son sitios que corresponden a áreas propensas a la mutación durante el proceso de maduración somática de la afinidad. Véase, por ejemplo, Chowdhury y Pastan, Nature Biotech., 17: 568-572 (1999) y las referencias en el mismo. En determinadas realizaciones, pueden usarse ciertos tipos de elementos de ADN para identificar sitios de hipermutación que incluyen, pero sin limitación, ciertas repeticiones directas e invertidas, ciertas secuencias consenso, ciertas estructuras secundarias y ciertos palíndromos. Por ejemplo, dichos elementos de ADN que pueden usarse para identificar sitios de hipermutación incluyen, pero sin limitación, una secuencia de tetrabase que comprende una purina (A o G), seguida de guanina (G), seguida que una pirimidina (C o T), seguida de adenosina o timidina (A o T) (es decir, A/G-G-C/T-A/T). Otro ejemplo de un elemento de ADN que puede usarse para identificar sitios de hipermutación es el codón de serina, A-G-C/T.

Preparación de ABP (por ejemplo, anticuerpos) completamente humanas

En determinadas realizaciones, se usa una técnica de presentación en fagos para generar anticuerpos monoclonales. En determinadas realizaciones, dichas técnicas producen anticuerpos monoclonales completamente humanos. En determinadas realizaciones, un polinucleótido que codifica un solo fragmento de anticuerpo Fab o Fv en la superficie de una partícula de fago. Véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J Mol Biol 222: 581 (1991); Patente de los Estados Unidos n.º 5.885.793. En determinadas realizaciones, los fagos se someten a "detección sistemática" para identificar aquellos fragmentos de anticuerpo que tienen afinidad por la diana. Por tanto, algunos de dichos procesos imitan la selección inmunitaria mediante la presentación de repertorios de fragmento de anticuerpo sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos y la posterior selección del fago por su unión a la diana. En algunos de dichos procedimientos, se aíslan fragmentos de anticuerpo neutralizantes funcionales de alta afinidad. En algunas de dichas realizaciones (analizadas en más detalle más adelante), se crea un repertorio completo de genes de anticuerpo humano clonando genes V humanos reorganizados de linfocitos de sangre periférica. Véase, por ejemplo, Mullinax *et al.*, Proc Natl Acad Sci (USA), 87: 8095-8099 (1990).

De acuerdo con ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se preparan mediante la utilización de un ratón transgénico que tiene una porción sustancial del genoma productor de anticuerpo humano insertado pero que se hace deficiente en la producción de anticuerpos endógenos murinos. Dichos ratones, por tanto, son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para lograr este resultado se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la memoria descriptiva, en el presente documento. En determinadas realizaciones, se pueden emplear métodos tales como los divulgados en la Solicitud PCT Publicada n.º WO 98/24893 o en Mendez *et al.*, Nature Genetics, 15:146-156 (1997).

En general, pueden producirse como se expone a continuación ABP (por ejemplo, anticuerpos) monoclonales humanas específicas para PCSK9. Los ratones transgénicos que contienen genes de inmunoglobulina humanos se inmunizan con el antígeno de interés, por ejemplo, PCSK9, y se obtienen células linfáticas (tales como linfocitos B) de los ratones que expresan anticuerpos. Dichas células recuperadas se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales y dichas células de hibridoma se detectan de manera sistemática y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En determinadas realizaciones, se proporciona la producción de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos específicos para PCSK9.

En determinadas realizaciones, se producen anticuerpos completamente humanos exponiendo esplenocitos humanos (linfocitos B o T) a un antígeno *in vitro* y después, se reconstituyen las células expuestas en un ratón inmunocomprometido, por ejemplo, SCID o nod/SCID. Véase, por ejemplo, Brams *et al*., J. Immunol. 160: 2051-2058 (1998); Carballido *et al.*, Nat. Med., 6: 103-106 (2000). En algunas de dichas estrategias, el injerto de tejido fetal humano en ratones SCID (SCID-hu) da como resultado la hematopoyesis a largo plazo y el desarrollo de linfocitos T humanos. Véase, por ejemplo, McCune *et al.*, Science, 241:1532-1639 (1988); Ifversen *et al.*, Sem. Immunol., 8:243-248 (1996). En determinados casos, la respuesta inmunitaria humoral en dichos ratones quiméricos es dependiente del desarrollo conjunto de linfocitos T humanos en los animales. Véase, por ejemplo, Martensson *et al.*, Immunol., 83:1271-179 (1994). En ciertas estrategias, se trasplantan linfocitos de sangre periférica humana en ratones SCID. Véase, por ejemplo, Mosier *et al.*, Nature, 335:256-259 (1988). En determinadas realizaciones similares, cuando se tratan dichas células trasplantadas o bien con un agente de cebado, tal como enterotoxina A estafilocócica (SEA) o con anticuerpos monoclonales anti-CD40 humano, se detectan mayores niveles de producción de linfocitos B. Véase, por ejemplo, Martensson *et al.*, Immunol., 84: 224-230 (1995); Murphy *et al.*, Blood, 86:1946-1953 (1995).

Por tanto, en ciertas realizaciones, pueden producirse anticuerpos completamente humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma. En otras realizaciones, pueden producirse anticuerpos usando las técnicas de presentación en fagos descritas en el presente documento.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se prepararon utilizando la tecnología XenoMouse®, como se describe en el presente documento. Dichos ratones, por tanto, son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para lograr esto se divulgan en las patentes, solicitudes y referencias divulgadas en la sección de antecedentes anterior. En particular, sin embargo, se divulga una realización preferida de producción transgénica de ratones y anticuerpos a partir de los mismos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las Solicitudes de Patente Internacional n.º WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Véase también Mendez *et al.*, Nature Genetics, 15:146-156 (1997).

Mediante el uso de dicha tecnología, se han producido anticuerpos monoclonales completamente humanos contra una variedad de antígenos. Esencialmente, las líneas de ratones XenoMouse® se inmunizan con un antígeno de interés (por ejemplo, PCSK9), se recuperan células linfáticas (tales como linfocitos B) de los ratones hiperinmunizados y los linfocitos recuperados se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales. Estas líneas celulares de hibridoma se exploran y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En el presente documento se proporcionan métodos para la producción de múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para PCSK9. Además, en el presente documento se proporciona la caracterización de anticuerpos producidos por dichas líneas celulares, incluyendo análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de dichos anticuerpos.

La producción de estirpes de ratón XenoMouse® se analiza y explica adicionalmente en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos con n.º de serie 07/466.008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610.515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919.297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922.649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031.801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112.848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234.145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376.279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430.938, presentada el 27 de abril de 1995, 08/464.584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464.582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463.191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486.859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462.513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724.752, presentada el 2 de octubre de 1996, 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, la Publicación de los Estados Unidos 2003/0093820, presentada el 30 de noviembre de 2001 y las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las Patentes Japonesas n.º 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véase también la Patente Europea n.º EP 0 463 151 B1, con publicación de la concesión el 12 de junio de 1996, la Solicitud de Patente Internacional n.º WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la Solicitud de Patente Internacional n.º WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000.

En una estrategia alternativa, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado una estrategia de "minilocus". En la estrategia de minilocus, se imita un locus de Ig exógeno mediante la inclusión de porciones (genes individuales) del locus de Ig. Por tanto, se forman en una construcción uno o más genes de V_H, uno o más genes de D_H, uno o más genes de J_H una región constante mu y normalmente una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) para su inserción en un animal. Esta estrategia se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.545.807, concedida a Surani *et al*. y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458 cada una concedida a Lonber y Kay, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.591.669 y 6.023,010 concedidas a Krimpenfort y Berns, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 concedidas a Berns et al. y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.643.763 concedida a Choi y Dunn y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos concedidas a GenPharm con n.º de serie 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véase también la Patente Europea n.º 0 546 073 B1, las Solicitudes de Patente Internacional n.º WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.981.175. Véase además Taylor *et al.,* 1992, Chen *et al.,* 1993, Tuaillon *et al.,* 1993, Choi *et al.,* 1993, Lonberg *et al.,* (1994), Taylor *et al.,* (1994) y Tuaillon *et al.,* (1995), Fishwild *et al.,* (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos de ratones en los que, mediante fusión de microcélulas, se han introducido grandes trozos de cromosomas o cromosomas completos. Véanse las Solicitudes de Patente Europeas n.º 773 288 y 843 961. Además, Los ratones KM™, que son el resultado del cruce de ratones Tc de Kirin con ratones que se han generado con el minilocus de Medarex (Humab). Estos ratones poseen el

transcromosoma de IgH humano del ratón de Kirin y el transgén de cadena kappa de los ratones de GenPharm (Ishida *et al*., Cloning Stem Cells, (2002) 4:91-102).

Los anticuerpos humanos también pueden obtenerse mediante métodos *in vitro*. Los ejemplos adecuados incluyen, pero sin limitación, presentación en fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed) presentación en ribosomas (CAT), presentación en levadura y similares.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento poseen cadenas pesadas de IgG4, así como cadenas pesadas de IgG2 humanas. Los anticuerpos también pueden ser de otros isotipos humanos, incluyendo IgG1. Estos anticuerpos poseen altas afinidades, poseyendo normalmente una Kd de aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10^{-13} M o menos, cuando se mide mediante diversas técnicas.

Como se apreciará, los anticuerpos pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden usarse para transformar células hospedadoras de mamífero adecuadas. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo, el empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transduciendo una célula hospedadora con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ilustra por las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. El procedimiento de transformación usado depende del hospedador que se vaya a transformar. Se conocen bien métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión se conocen bien en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tip (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células epiteliales de riñón humano 293 y una serie de líneas celulares diferentes. Las líneas celulares particularmente preferidas se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a PCSK9 constitutivas.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos y/o las ABP se producen por al menos uno de los siguientes hibridomas: 21B12, 31H4, 16F12, cualquier otro hibridoma listado en la tabla 2 o divulgado en los ejemplos. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se unen a PCSK9 con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 1 nM, por ejemplo, de 1000 pM a 100 pM, de 100 pM a 10 pM, de 10 pM a 1 pM y/o de 1 pM a 0,1 pM o menos.

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una molécula de inmunoglobulina de al menos uno de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera kappa y/o una cadena pesada humana. En determinadas realizaciones, la cadena pesada es del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD o IgM. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se han clonado para su expresión en células de mamífero. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una región constante distinta de cualquiera de las regiones constantes de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA, IgD e IgM.

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera lambda y una cadena pesada de IgG2 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera lambda y una cadena pesada de IgG4 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera lambda y una cadena pesada de IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD o IgM humana. En otras realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG2 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera kappa humana y una cadena pesada de IgG4 humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden una cadena ligera kappa y una cadena pesada de IgG1, IgG3, IgE, IgA, IgD o IgM humana. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden regiones variables de anticuerpos ligados a una región constante que ni es la región constante para el isotipo IgG2, ni la región constante para el isotipo IgG4. En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se han clonado para su expresión en células de mamífero.

En determinadas realizaciones, las modificaciones conservativas en las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de al menos una de las líneas de hibridoma: 21B12, 31H4 y 16F12 (y las modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificantes) producirán anticuerpos dirigidos contra PCSK9 que tienen características funcionales y químicas similares a las de los anticuerpos de las líneas de hibridoma: 21B12, 31H4 y 16F12. Por el contrario, en ciertas realizaciones, pueden lograrse modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de los anticuerpos dirigidos contra PCSK9 seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras que difieren significativamente en su efecto a la hora de mantener (a) la estructura de la cadena principal molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, en forma de una conformación de lámina o helicoidal, (b)

la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral.

Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservativa" puede implicar una sustitución de un resto de aminoácido nativo con un resto no nativo, de tal forma que se produce poco o ningún efecto en la polaridad o carga del resto de aminoácido en dicha posición. Además, también puede sustituirse cualquier resto nativo en el polipéptido por alanina, como se ha descrito previamente para la "mutagénesis de barrido de alanina".

Los expertos en la materia pueden determinar las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) en el momento en que tales sustituciones se desean. En determinadas realizaciones, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar restos importantes de los anticuerpos dirigidos contra PCSK9 o para aumentar o reducir la afinidad de los anticuerpos dirigidos contra PCSK9, como se describen en el presente documento.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. En determinadas realizaciones, pueden usarse secuencias que codifican anticuerpos particulares para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada. De acuerdo con ciertas realizaciones, la transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo, el empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transduciendo una célula hospedadora con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ilustra por las Estados de los Estados Unidos n.º 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. En determinadas realizaciones, el procedimiento de transformación usado puede depender del hospedador que se vaya a transformar. Se conocen bien en la técnica métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Se conocen bien en la técnica líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores de expresión e incluyen, pero sin limitación, muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y una serie de líneas celulares diferentes. En determinadas realizaciones, las líneas celulares pueden seleccionarse determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a HGF constitutivas. Se conocen bien vectores de expresión adecuados para células hospedadoras de mamífero.

En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno comprenden uno o más polipéptidos. En determinadas realizaciones, puede utilizarse cualquiera de una variedad de sistemas de vector de expresión/hospedador para expresar moléculas de polinucleótido que codifican polipéptidos que comprenden uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí. Dichos sistemas incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido recombinantes; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transfectados con vectores de expresión víricos (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

En determinadas realizaciones, se expresa de manera en levadura un polipéptido que comprende uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí. Algunas de dichas realizaciones usan sistemas de expresión disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de expresión en *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En determinadas realizaciones, dicho sistema se basa en la secuencia pre-pro-alfa para dirigir la secreción. En determinadas realizaciones, la transcripción del inserto está impulsada por el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) tras la inducción por metanol.

En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido secretado que comprende uno o más componentes de ABP o la ABP en sí a partir de medio de crecimiento de levadura. En determinadas realizaciones, los métodos usados para purificar un polipéptido a partir de medio de crecimiento de levadura son los mismos que los usados para purificar el polipéptido de sobrenadantes de células bacterianas y de mamífero.

En determinadas realizaciones, se clona un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí en un vector de expresión de baculovirus, tal como pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA). En determinadas realizaciones, dicho vector puede usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medio libre de proteínas sF9 y producir polipéptido recombinante. En determinadas realizaciones, se purifica y concentra un polipéptido a partir de dichos medios usando una columna de heparina-Sepharose (Pharmacia).

En determinadas realizaciones, se expresa un polipéptido que comprende uno o más componentes de la ABP o la

ABP en sí en un sistema de insecto. Los expertos en la materia conocen bien ciertos sistemas de insecto para la expresión de polipéptidos. En un sistema de este tipo, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes exógenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. En determinadas realizaciones, puede insertarse una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido en un gen no esencial del virus, por ejemplo, en el gen de poliedrina y colocarse bajo el control del promotor para ese gen. En determinadas realizaciones, la inserción con éxito de una molécula de ácido nucleico inactivará el gen no esencial. En determinadas realizaciones, dicha inactivación da como resultado una característica detectable. Por ejemplo, la inactivación del gen de poliedrina da como resultado la producción de virus que carece de proteína de la envuelta.

En determinadas realizaciones, pueden usarse virus recombinantes para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia*. Véase, por ejemplo, Smith *et al.*, J. Virol., 46: 584 (1983); Engelhard *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 91: 3224-7 (1994).

En determinadas realizaciones, los polipéptidos que comprenden uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí producidos en células bacterianas se producen en forma de cuerpos de inclusión insolubles en las bacterias. En determinadas realizaciones, se recogen células hospedadoras que comprenden dichos cuerpos de inclusión mediante centrifugación; se lavan en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y se tratan con 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 minutos a temperatura ambiente. En determinadas realizaciones, el lisado se aclara mediante ultrasonidos y los restos celulares se sedimentan mediante centrifugación durante 10 minutos a 12.000 x g. En determinadas realizaciones, el sedimento que contiene polipéptido se resuspende en Tris 50 mM, pH 8 y EDTA 10 mM; se dispone sobre glicerol al 50 %; y se centrifuga durante 30 minutos a 6000 X g. En determinadas realizaciones, puede resuspenderse dicho sedimento en solución salina tamponada con fosfato (PBS) convencional libre de Mg^{++} y Ca^{++}. En determinadas realizaciones, el polipéptido se purifica adicionalmente fraccionando el sedimento resuspendido en un gel de SDS poliacrilamida desnaturalizante (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, anteriormente citado). En determinadas realizaciones, dicho gel puede sumergirse en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que puede cortarse y electroeluirse en tampón de ejecución del gel que carece de SDS. De acuerdo con ciertas realizaciones, se produce una proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) en bacterias en forma de una proteína soluble. En determinadas realizaciones, dicha proteína de fusión de GST se purifica un módulo de purificación de GST (Pharmacia).

En determinadas realizaciones, es deseable "replegar" ciertos polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos que comprenden uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí. En determinadas realizaciones, dichos polipéptidos se producen usando ciertos sistemas recombinantes analizados en el presente documento. En determinadas realizaciones, los polipéptidos se "repliegan" y/u oxidan para formar la estructura terciaria deseada y/o para generar enlaces disulfuro. En determinadas realizaciones, dicha estructura y/o enlaces están relacionados con una determinada actividad biológica de un polipéptido. En determinadas realizaciones, el replegamiento se logra usando cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen, pero sin limitación, exponer el agente polipeptídico solubilizado a un pH normalmente mayor de 7 en presencia de un agente caotrópico. Un agente caotrópico ejemplar es la guanidina. En determinadas realizaciones, la solución de replegado/oxidación también contiene un agente reductor y la forma oxidada de dicho agente reductor. En determinadas realizaciones, el agente reductor y su forma oxidada están presentes en una relación que generará un potencial redox particular que permite que se produzca el reordenamiento de disulfuros. En determinadas realizaciones, dicho reordenamiento permite la formación de puentes de cisteína. Los pares redox ejemplares incluyen, pero sin limitación, cisteína/cistamina, glutatión/ditiobisGSH, cloruro cúprico, ditiotreitol DTT/ditiano DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/ditio-bME. En determinadas realizaciones, se usa un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento. Los codisolventes ejemplares incluyen, pero sin limitación, glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y arginina.

En determinadas realizaciones, se purifica sustancialmente un polipéptido que comprende uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí. Los expertos en la materia conocen determinadas técnicas de purificación de proteínas. En determinadas realizaciones, la purificación de proteínas implica el fraccionamiento en bruto de fracciones de polipéptido de las fracciones no polipeptídicas. En determinadas realizaciones, los polipéptidos se purifican usando técnicas cromatográficas y/o electroforéticas. Los métodos de purificación ilustrativos incluyen, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio; precipitación con PEG; inmunoprecipitación; desnaturalización por calor seguida de centrifugación; cromatografía, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína-A-Sepharose), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía en fase reversa; filtración en gel; cromatografía de hidroxiapatita; isoelectroenfoque; electroforesis en gel de poliacrilamida; y combinaciones de estas y otras técnicas. En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido mediante cromatografía líquida rápida de proteínas o mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En determinadas realizaciones, pueden cambiarse las etapas de purificación o pueden omitirse determinadas etapas y seguir dando como resultado un método para la preparación de un polipéptido sustancialmente purificado.

En determinadas realizaciones, se cuantifica el grado de purificación de una preparación de polipéptido. Los expertos en la materia conocen ciertos métodos para cuantificar el grado de purificación. Ciertos métodos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, determinar la actividad de unión específica de la preparación y evaluar la cantidad de un polipéptido en una preparación mediante análisis por SDS/PAGE. Ciertos métodos ejemplares para evaluar la cantidad de

purificación de una preparación de polipéptido comprenden calcular la actividad de unión de una preparación y compararla con la actividad de unión de un extracto inicial. En determinadas realizaciones, los resultados de dicho cálculo se expresan como "múltiplo de purificación". Las unidades usadas para representar la cantidad de actividad de unión dependen del ensayo particular llevado a cabo.

En determinadas realizaciones, se purifica un polipéptido que comprende uno o más componentes de la ABP o la ABP en sí. En determinadas realizaciones, la purificación parcial puede lograrse usando menos etapas de purificación o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la cromatografía en columna de intercambio catiónico efectuada utilizando un aparato de HPLC dará generalmente como resultado un mayor "múltiplo de purificación" que la misma técnica usando un sistema de cromatografía de baja presión. En determinadas realizaciones, los métodos que dan como resultado un menor grado de purificación pueden tener ventajas en la recuperación total del polipéptido o en el mantenimiento de la actividad de unión de un polipéptido.

En determinados casos, la migración electroforética de un polipéptido puede variar, en ocasiones de manera significativa, con las diferentes condiciones de SDS/PAGE. Véase, por ejemplo, Capaldi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76: 425 (1977). Se apreciará que en diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes del polipéptido purificado o parcialmente purificado pueden ser diferentes.

Epítopos ejemplares

Se proporcionan epítopos a los que se unen los anticuerpos anti-PCSK9. En algunas realizaciones, son particularmente útiles los epítopos a los que se unen los anticuerpos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, son útiles proteínas de unión a antígeno que se unen a cualquiera de los epítopos a los que se unen los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los epítopos a los que se unen cualquiera de los anticuerpos listados en la tabla 2 y las FIG. 2 y 3 son especialmente útiles. En algunas realizaciones, el epítopo se encuentra en el dominio catalítico de PCSK9.

En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 para prevenir (por ejemplo, reducir) la unión de un anticuerpo anti-PCSK9 o de una proteína de unión a antígeno a PCSK9. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 para reducir la unión de un anticuerpo anti-PCSK9 o de una proteína de unión a antígeno a PCSK9. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 para inhibir sustancialmente la unión de un anticuerpo anti-PCSK9 o de una proteína de unión a antígeno a PCSK9.

En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 para aislar anticuerpos o proteínas de unión a antígeno que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 para generar anticuerpos o proteínas de unión a antígeno que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 o una secuencia que comprende un epítopo de PCSK9 como inmunógeno para generar anticuerpos o proteínas de unión a antígeno que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, puede administrarse un epítopo de PCSK9 a un animal y posteriormente pueden obtenerse del animal anticuerpos que se unen a PCSK9. En determinadas realizaciones, puede utilizarse un epítopo de PCSK9 o una secuencia que comprende un epítopo de PCSK9 para interferir con la actividad normal mediada por PCSK9, tal como la asociación de PCSK9 con el LDLR.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno divulgadas en el presente documento se unen específicamente al prodominio N-terminal, un dominio catalítico similar de tipo subtilisina y/o un dominio C-terminal. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une al surco de unión a sustrato de PCSK-9 (descrito en Cunningham *et al.)*.

En algunas realizaciones, los dominio/regiones que contienen restos que se encuentran en contacto con o están enterrados por un anticuerpo pueden identificarse mutando restos específicos en PCSK9 (por ejemplo, un antígeno de tipo silvestre) y determinando si la proteína de unión a antígeno puede unirse a la proteína PCSK9 mutada o variante. Al efectuar una serie de mutaciones individuales, pueden identificarse restos que desempeñan un papel directo en la unión o que se encuentran lo suficientemente próximos al anticuerpo, de tal forma que una mutación puede afectar a la unión entre la proteína de unión a antígeno y el antígeno. Una vez conocidos estos aminoácidos, pueden dilucidarse los dominios o regiones del antígeno que contienen restos en contacto con la proteína de unión a antígeno o abarcados por el anticuerpo. Dicho dominio puede incluir el epítopo de unión de una proteína de unión a antígeno. Un ejemplo específico de esta estrategia general utiliza un protocolo de barrido de arginina/ácido glutámico (véase, por ejemplo, Nanevicz, T., *et al.*, 1995, J Biol. Chem., 270:37, 21619-21625 y Zupnick, A., *et al.*, 2006, J. Biol. Chem., 281:29, 20464-20473). En general, se sustituyen las argininas y los ácidos glutámicos (normalmente de manera individual) por un aminoácido en el polipéptido de tipo silvestre debido a que estos aminoácidos están cargados y son voluminosos y por tanto, tienen el potencial de alterar la unión entre una proteína de unión a antígeno y un antígeno en la región del antígeno donde se introduce la mutación. Las argininas que existen en el antígeno de tipo silvestre se reemplazan por ácido glutámico. Se obtiene una variedad de dichos mutantes individuales y los resultados de unión recogidos se analizan para determinar qué restos afectan a la unión.

Una alteración (por ejemplo, una reducción o aumento) en la unión entre una proteína de unión a antígeno y una

PCSK9 variante como se usa en el presente documento significa que hay un cambio en la afinidad de unión (por ejemplo, medida mediante métodos conocidos, tales como pruebas Biacore o el ensayo basado en perlas descrito más adelante en los ejemplos), la CE_{50} y/o un cambio (por ejemplo, una reducción) en la capacidad de unión total de la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, evidenciada por una reducción en la Bmáx en una gráfica de concentración de proteína de unión a antígeno frente a concentración de antígeno). Una alteración significativa en la unión indica que el resto mutado está implicado directamente en la unión a la proteína de unión a antígeno o se encuentra en estrecha proximidad a la proteína de unión cuando la proteína de unión está unida al antígeno.

En algunas realizaciones, una reducción significativa en la unión significa que la afinidad de unión, la CE50 y/o la capacidad entre una proteína de unión a antígeno y un antígeno de PCSK9 mutado está reducida en más de un 10 %, más de un 20 %, más de un 40 %, más de un 50 %, más de un 55 %, más de un 60 %, más de un 65 %, más de un 70 %, más de un 75 %, más de un 80 %, más de un 85 %, más de un 90 % o más de un 95 % en relación con la unión entre la proteína de unión a antígeno y una PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, mostrada en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: (303). En determinadas realizaciones, La unión se reduce por debajo de límites detectables. En algunas realizaciones, se evidencia una reducción significativa en la unión cuando la unión de una proteína de unión a antígeno a una proteína PCSK9 variante es menos de un 50 % (por ejemplo, menos de un 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 % o 10 %) de la unión observada entre la proteína de unión a antígeno y una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la proteína de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: (303). Dichas mediciones de unión pueden efectuarse usando una variedad de ensayos de unión conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, se proporcionan proteínas de unión a antígeno que muestran una unión significativamente menor para una proteína PCSK9 variante en la que se sustituye un resto en una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303 por arginina o ácido glutámico. En algunas realizaciones, se reduce o aumenta significativamente la unión de una proteína de unión a antígeno para una proteína PCSK9 variante que tiene una cualquiera o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 244) de las siguientes mutaciones: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R y Q554R en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En la notación abreviada usada en el presente documento, el formato es: Resto de tipo silvestre: Posición en el polipéptido: resto mutante, con la numeración de los restos como se indica en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303.

En algunas realizaciones, se reduce o aumenta significativamente la unión de una proteína de unión a antígeno para una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones en las siguientes posiciones: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554, como se muestran en la SEQ ID NO: 1, en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303). En algunas realizaciones, se reduce o aumenta la unión de una proteína de unión a antígeno para una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones en las siguientes posiciones: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554, como se muestran en la SEQ ID NO: 1, en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303). En algunas realizaciones, se reduce o aumenta sustancialmente la unión de una proteína de unión a antígeno para una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más) mutaciones en las siguientes posiciones: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554, en la SEQ ID NO: 1, en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303).

En algunas realizaciones, se reduce o aumenta significativamente la unión de una ABP para una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.) de las siguientes mutaciones: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R, E582R, D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R y Q554R en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303, en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303).

En algunas realizaciones, se reduce o aumenta significativamente la unión de una ABP para una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.) de las siguientes mutaciones: R207E, D208R, R185E, R439E, E513R, V538R, E539R, T132R, S351R, A390R, A413R y E582R en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303, en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303). En algunas realizaciones, se reduce la unión. En algunas realizaciones, la reducción en la unión se observa como un cambio en la CE50. En algunas realizaciones, el cambio en la CE50 es un aumento en el valor numérico de la CE50 (y por tanto, es una reducción en la unión).

En algunas realizaciones, se reduce o aumenta significativamente la unión de una ABP para una proteína PCSK9 mutante que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, etc.) de las siguientes mutaciones: D162R, R164E, E167R, S123R, E129R, A311R, D313R, D337R, R519E, H521R y Q554R en la SEQ ID NO: 1, en comparación con una proteína PCSK9 de tipo silvestre (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303). En algunas realizaciones, se reduce la unión. En algunas realizaciones, la reducción en la unión se observa como un cambio en la Bmáx. En algunas realizaciones, el cambio en la Bmáx es una reducción de la señal máxima generada por la ABP. En algunas realizaciones, para que un aminoácido forme parte de un epítopo, la Bmáx se reduce en al menos un 10 %, por

ejemplo, las reducciones de al menos cualquiera de las siguientes cantidades: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 o 100 por ciento pueden, en algunas realizaciones, indicar que el resto forma parte del epítopo.

Aunque las formas variantes anteriormente listadas se referencian con respecto a la secuencia de tipo silvestre mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303, se apreciará que en una variante alélica de PCSK9, puede diferir el aminoácido en la posición indicada. También se contemplan proteínas de unión a antígeno que muestran una unión significativamente menor por dichas formas alélicas de PCSK9. Por consiguiente, en algunas realizaciones, puede compararse cualquiera de las realizaciones anteriores con una secuencia alélica, en lugar de simplemente la secuencia de tipo silvestre mostrada en la FIG 1A.

En algunas realizaciones, se reduce significativamente la unión de una proteína de unión a antígeno por una proteína PCSK9 variante en la que el resto en una posición seleccionada en la proteína PCSK9 de tipo silvestre se muta a otro resto. En algunas realizaciones, los reemplazos de arginina/ácido glutámico descritos en el presente documento se usan para las posiciones identificadas. En algunas realizaciones, se usa alanina para las posiciones identificadas.

Como se indicó anteriormente, pueden identificarse restos directamente implicados en la unión o cubiertos por una proteína de unión a antígeno a partir de los resultados del barrido. Estos restos pueden proporcionar, por tanto, una indicación de los dominios o regiones de la SEQ ID NO: 1 (o la SEQ ID NO: 303 o la SEQ ID NO: 3) que contienen las regiones de unión a las que se unen las proteínas de unión a antígeno. Como puede observarse a partir de los resultados resumidos en el ejemplo 39, en algunas realizaciones, una proteína de unión a antígeno se une a un dominio que contiene al menos uno de los aminoácidos: 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 207, 208, 185, 181, 439, 513, 538, 539, 132, 351, 390, 413, 582, 162, 164, 167, 123, 129, 311, 313, 337, 519, 521 y 554 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 162, 164, 167, 207 y/o 208 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En algunas realizaciones, más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) de los restos identificados forman parte de la región a la que se une la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compite con la ABP 21B12.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a una región que contiene al menos uno del aminoácido 185 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En algunas realizaciones, la ABP compite con la ABP 31H4.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 439, 513, 538 y/o 539 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En algunas realizaciones, más de uno (por ejemplo, 2, 3 o 4) de los restos identificados forman parte de la región a la que se une la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compite con la ABP 31A4.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 123, 129, 311, 313, 337, 132, 351, 390 y/o 413 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En algunas realizaciones, más de uno (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) de los restos identificados forman parte de la región a la que se une la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compite con la ABP 12H 11.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a una región que contiene al menos uno de los aminoácidos 582, 519, 521 y/o 554 de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En algunas realizaciones, más de uno (por ejemplo, 2, 3 o 4) de los restos identificados forman parte de la región a la que se une la ABP. En algunas realizaciones, la ABP compite con la ABP 3C4.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se une a las regiones anteriores en un fragmento de la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303. En otras realizaciones, las proteínas de unión a antígeno se unen a polipéptidos que consisten en estas regiones. La referencia a la "SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 303" indica que pueden emplearse o son relevantes una o ambas de estas secuencias. La frase no indica que se deba emplear solo una.

Como se indicó anteriormente, la descripción anterior hace referencia a las posiciones de aminoácidos específicas por referencia a la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, a lo largo de la memoria descriptiva en general, se hace referencia a un dominio de Pro/Cat que comienza en la posición 31, que se proporciona en la SEQ ID NO: 3. Como se indica a continuación, la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 303 carecen de la secuencia de señal de PCSK9. Como tales, cualquier comparación entre estas diversas divulgaciones debe tener en cuenta esta diferencia en la numeración. En particular, cualquier posición de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1, corresponderá a una posición de aminoácidos desplazada en 30 aminoácidos en la proteína en la SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, la posición 207 de la SEQ ID NO: 1, corresponde a la posición 237 de la SEQ ID NO: 3 (la secuencia de longitud completa y el sistema de numeración usado generalmente en la presente memoria descriptiva). La tabla 39.6 indica cómo las posiciones indicadas anteriormente, que hacen referencia a la SEQ ID NO: 1 (y/o la SEQ ID NO: 303) corresponden a la SEQ ID NO: 3 (que incluye la secuencia de señal). Por tanto, cualquiera de las realizaciones anteriormente indicadas que se describen con respecto a la SEQ ID

NO: 1 (y/o la SEQ ID NO: 303) se describen en referencia a la SEQ ID NO: 3, mediante las posiciones correspondientes anotadas.

En algunas realizaciones, la ABP 21B12 se une a un epítopo que incluye los restos 162-167 (por ejemplo, los restos D162-E167 de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la ABP 12H11 se une a un epítopo que incluye los restos 123-132 (por ejemplo, S123-T132 de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, la ABP 12H11 se une a un epítopo que incluye los restos 311-313 (por ejemplo, A311-D313 de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las ABP pueden unirse a un epítopo que incluye una cualquiera de estas hebras de las secuencias.

Proteínas de unión a antígeno competitivas

En otro aspecto, se proporcionan proteínas de unión a antígeno que compiten con uno de los anticuerpos ejemplificados o fragmentos funcionales que se unen al epítopo descrito en el presente documento por la unión específica a PCSK9. Dichas proteínas de unión a antígeno también pueden unirse al mismo epítopo que una de las proteínas de unión a antígeno ejemplificadas en el presente documento o un epítopo solapante. Se espera que las proteínas de unión a antígeno y los fragmentos que compiten con o que se unen al mismo epítopo que las proteínas de unión a antígeno ejemplificadas muestren propiedades funcionales similares. Las proteínas y fragmentos de unión a antígeno ejemplificados incluyen aquellos descritos anteriormente, incluyendo aquellos con las cadenas pesadas y ligeras, dominios de región variable y CDR incluidas en la TABLA 2 y/o las FIG. 2-3. Por tanto, a modo de ejemplo específico, las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan incluyen aquellas que compiten con un anticuerpo o una proteína de unión a antígeno que tiene:

(a) las 6 CDR listadas para un anticuerpo listado en las FIG. 2-3;
(b) una VH y una VL listada para un anticuerpo listado en la tabla 2; o
(c) dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas especificadas para un anticuerpo listado en la tabla 2.

Formulaciones farmacéuticas terapéuticas y administración

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que contienen proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9. Como se usa en el presente documento, una "formulación farmacéutica" es una composición estéril de un fármaco farmacéuticamente activo, a saber, al menos una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, que es adecuada para administración parenteral (incluyendo, pero sin limitación, intravenosa, intramuscular, subcutánea, en aerosol, intrapulmonar, intranasal o intratecal) a un paciente que lo necesite e incluye únicamente excipientes, diluyentes y otros aditivos farmacéuticamente aceptables considerados como seguros por la Administración Federal de Fármacos u otras autoridades nacionales extranjeras. Las formulaciones farmacéuticas incluyen soluciones líquidas, por ejemplo, acuosas, que pueden administrarse directamente y polvos liofilizados que pueden reconstituirse en soluciones añadiendo un diluyente antes de la administración. Se excluyen específicamente del alcance de la expresión "formulación farmacéutica" las composiciones para administración tópica a pacientes, composiciones para ingestión oral y composiciones para alimentación parenteral.

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica estable. Como se usa en el presente documento, las frases, "formulación farmacéutica estable", "formulación estable" o "una formulación farmacéutica es estable" se refiere a una formulación farmacéutica de proteínas biológicamente activas que muestran agregación aumentada y/o pérdida reducida de actividad biológica de no más del 5 % cuando se almacena a 2-8 °C durante al menos 1 mes o 2 meses o 3 meses o 6 meses o 1 año o 2 años en comparación con una muestra de fórmula de control. La estabilidad de la formulación puede determinarse fácilmente por un experto en la materia usando cualquier número de ensayos convencionales, incluyendo, pero sin limitación, HPLC de exclusión por tamaños ("SEC-HPLC"), HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC), detección de partículas subvisibles mediante oscurecimiento de luz ("HIAC") y/o inspección visual.

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende cualquiera de las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 representadas en la tabla 2 y las FIG. 2 y/o 3. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende una cualquiera de 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 1IF1 u 8A1.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende más de una proteína de unión a antígeno diferente dirigida contra PCSK9. En determinadas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas comprenden más de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, en donde las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 se unen a más de un epítopo. En algunas realizaciones, las diversas proteínas de unión a antígeno no compiten entre sí por la unión a PCSK9. En algunas realizaciones, se puede combinar cualquiera de las proteínas de unión a antígeno representadas en la tabla 2 y las FIG. 2 y/o 3 juntas en una formulación farmacéutica.

En determinadas realizaciones, se liga una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 y/o una molécula terapéutica a un vehículo prolongador de la semivida conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol, glucógeno (por ejemplo, glucosilación de la ABP) y dextrano. Dichos vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de los Estados Unidos con n.º de serie 09/428.082, actualmente Patente de los Estados Unidos n.º 6.660.843 y solicitud PCT publicada n.º WO 99/25044.

En determinadas realizaciones, los materiales de formulación aceptables preferentemente no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. En algunas realizaciones, los materiales de formulación son para administración s.c. y/o I.V. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición.

En determinadas realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como prolina, arginina, lisina, metionina, taurina, glicina, glutamina o asparagina); agentes antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, fosfato de sodio ("NaOAC"), Tris-HCl, tampón Tris, citratos, tampón fosfato, suero salino tamponado con fosfato (es decir, tampón PBS) u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, sacarosa, fructosa, lactosa, manosa, trehalosa o dextrinas); proteínas (tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos, tales como polisorbato 20, polisorbato 80, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18.ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1995).

En determinadas realizaciones, un experto en la materia determinará la formulación farmacéutica óptima dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de suministro y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences,* anteriormente citado. En determinadas realizaciones, dichas formulaciones pueden influenciar el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* de los anticuerpos de la invención.

En un aspecto, la formulación farmacéutica comprende altas concentraciones de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9. En determinadas realizaciones, la concentración de la ABP varía de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml, aproximadamente 230 mg/ml, aproximadamente 240 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml e incluyendo todos los valores intermedios. En algunas realizaciones, la concentración de 21B12, 26H5 o 31H4 varía de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, por ejemplo, 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de 8A3, 11F1 u 8A1 varía de aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 220 mg/ml, por ejemplo, 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml o aproximadamente 250 mg/ml.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica comprende al menos un agente tamponador, tal como, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, fosfatos, suero salino tamponado con fosfato ("PBS") y/o tampón Tris a un pH de aproximadamente 7,0-8,5. El tampón sirve para mantener un pH fisiológicamente adecuado. Además, el tampón puede servir para potenciar la isotonicidad y la estabilidad química de la formulación farmacéutica. En determinadas realizaciones, el agente tamponador oscila de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 5,0 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM o aproximadamente 100 nM de agente tamponador, incluyendo todos los valores intermedios. En determinadas realizaciones, el agente tamponador es NaOAC. Los pH ejemplares de la formulación farmacéutica incluyen de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 o de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,8 o de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2 o aproximadamente 5 o aproximadamente 5,2.

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica es isotónica, con una osmolalidad en el intervalo de entre aproximadamente 250 a aproximadamente 350 miliosmol/kg, por ejemplo, aproximadamente 250 mOsm/kg,

aproximadamente 260 mOsm/kg, aproximadamente 270 mOsm/kg, aproximadamente 280 mOsm/kg, aproximadamente 290 mOsm/kg, aproximadamente 300 mOsm/kg, aproximadamente 310 mOsm/kg, aproximadamente 320 mOsm/kg, aproximadamente 330 mOsm/kg, aproximadamente 340 mOsm/kg o aproximadamente 350 mOsm/kg en incluyendo todos los valores intermedios. Como se usa en el presente documento, la "osmolalidad" es la medida de la relación de solutos a volumen de fluido. En otras palabras, es el número de moléculas e iones (o moléculas) por kilogramo de una solución. La osmolalidad puede medirse en un instrumento analítico denominado osmómetro, tal como el osmómetro multimuestra Advanced Instruments 2020, Norwood, MA. El osmómetro multimuestra Advanced Instruments 2020 mide la osmolalidad usando el método de depresión del punto de congelación. A medida que aumentan los osmolitos en una solución, se reduce la temperatura a la que se congela. La osmolalidad también puede medirse usando cualquier otro método y en cualquier otra unidad conocida en la técnica, tal como extrapolación lineal.

En otro aspecto más, la formulación farmacéutica comprende al menos un tensioactivo que incluye, pero sin limitación, polisorbato-80, polisorbato-60, polisorbato-40 y polisorbato-20. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un tensioactivo a una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0,004 % a aproximadamente un 10 % en peso por volumen ("p/v") de la formulación, por ejemplo, aproximadamente un 0,004 %, aproximadamente un 0,005 %, aproximadamente un 0,006 %, aproximadamente un 0,007 %, aproximadamente un 0,008 %, aproximadamente un 0,009 %, aproximadamente un 0,01 %, aproximadamente un 0,05 %, aproximadamente un 0,1 %, aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 5 % o aproximadamente un 10 % de peso de tensioactivo/v de la formulación. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende polisorbato 80 a una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0,004 % a aproximadamente un 0,1 % p/v de la formulación. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende polisorbato 20 a una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0,004 % a aproximadamente un 0,1 % p/v de la formulación.

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende al menos un agente solubilizante, tal como un polihidroxi hidrocarburo (incluyendo, pero sin limitación, sorbitol, manitol, glicerol y dulcitol) y/o un disacárido (incluyendo, pero sin limitación, sacarosa, lactosa, maltosa y trehalosa) y/o un aminoácido (incluyendo, pero sin limitación, prolina, arginina, lisina, metionina y taurina) y/o alcohol bencílico; siendo el total de dicho polihidroxi hidrocarburo y/o disacárido y/o aminoácido y/o alcohol bencílico de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 10 % p/v de la formulación. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 % o aproximadamente un 10 % de sacarosa. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de aproximadamente un 5 % de sacarosa. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 9 % o aproximadamente un 10 % de sorbitol. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de aproximadamente un 9 % de sorbitol. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 % de prolina, arginina, lisina, metionina y/o taurina. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de entre aproximadamente un 2-3 % de prolina. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 5 % de alcohol bencílico. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un agente estabilizante a una concentración de entre aproximadamente un 1-2 % de alcohol bencílico.

En un aspecto, la formulación farmacéutica tiene un nivel de viscosidad de menos de aproximadamente 30 centipoise (cP) medida a temperatura ambiente (es decir, 25C). Como se usa en el presente documento, la "viscosidad" es la resistencia al flujo de un fluido y puede medirse en unidades de centipoise (cP) o de milipascales-segundo (mPa-s), donde 1 cP=1 mPa-s, a una velocidad de cizalladura dada. La viscosidad puede medirse usando un viscosímetro, por ejemplo, un viscosímetro con dial de lectura de Brookfield Engineering, modelo LVT. La viscosidad también puede medirse usando cualquier otro método y en cualquier otra unidad conocida en la técnica (por ejemplo, viscosidad absoluta, cinemática o dinámica o viscosidad absoluta). En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica tiene un nivel de viscosidad menor de aproximadamente 25 cP, aproximadamente 20 cP, aproximadamente 18 cP, aproximadamente 15 cP, aproximadamente 12 cP, aproximadamente 10 cP; aproximadamente 8 cP, aproximadamente 6 cP, aproximadamente 4 cP; aproximadamente 2 cP; o aproximadamente 1 cP.

En un aspecto, la formulación farmacéutica es estable, medida mediante al menos un ensayo de estabilidad conocido por un experto en la materia, tales como ensayos que examinan las características biofísicas o bioquímicas de las proteínas biológicamente activas con el paso del tiempo. Como se ha mencionado anteriormente, una formulación farmacéutica estable de la presente invención es una formulación farmacéutica de proteínas biológicamente activas que muestran agregación aumentada y/o una pérdida reducida de la actividad biológica de no más del 5 % cuando se

almacena a 2-8 °C durante al menos 1 mes o 2 meses o 3 meses o 6 meses o 1 año o 2 años en comparación con una muestra de fórmula de control. En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide usando HPLC de exclusión por tamaños ("SEC-HPLC"). La SEC-HPLC separa las proteínas basándose en las diferencias en sus volúmenes hidrodinámicos. Las moléculas con mayores volúmenes hidrodinámicos de proteína se eluyen más temprano que las moléculas con menores volúmenes. En el caso de la SEC-HPLC, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de aproximadamente un 5 % de aumento en las especies de alto peso molecular en comparación con una muestra de control. En ciertas realizaciones diferentes, la formulación farmacéutica debe mostrar no más de aproximadamente un 4 %, no más de aproximadamente un 3 %, no más de aproximadamente un 2 %, no más de aproximadamente un 1 %, no más de aproximadamente un 0,5 % de aumento en las especies de alto peso molecular en comparación con una muestra de control.

En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide usando HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC). La CEX-HPLC separa proteínas basándose en las diferencias en su carga de superficie. A un pH determinado, se separan las isoformas cargadas de una ABP anti-PCSK9 en una columna de intercambio catiónico y se eluyen usando un gradiente salino. El eluyente se monitoriza mediante absorbancia UV. La distribución de isoformas cargadas se evalúa determinando el área de pico de cada isoforma como un porcentaje del área de pico total. En el caso de la CEX-HPLC, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de aproximadamente un 5 % de reducción en el pico de la isoforma principal en comparación con una muestra de control. En ciertas realizaciones diferentes, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 % de reducción en el pico de la isoforma principal, en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica debe mostrar no más de aproximadamente un 4 % de reducción, no más de aproximadamente un 3 % de reducción, no más de aproximadamente un 2 % de reducción, no más de aproximadamente un 1 % de reducción, no más de aproximadamente un 0,5 % de reducción en el pico de la isoforma principal, en comparación con una muestra de control.

En determinadas realizaciones, se mide la estabilidad de la formulación farmacéutica usando detección de partículas subvisibles mediante oscurecimiento de luz ("HIAC"). Un sistema electrónico de recuento de partículas portadas en líquido (HIAC/Royco 9703 o equivalente) que contiene un sensor de oscurecimiento de luz (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un muestreador de líquidos cuantifica el número de partículas y su intervalo de tamaño en una muestra de ensayo dada. Cuando las partículas en un líquido pasan entre la fuente de luz y el detector, disminuyen u "oscurecen" el haz de luz que recae en el detector. Cuando la concentración de las partículas se encuentra dentro del intervalo normal del sensor, estas partículas se detectan de una en una. El paso de cada partícula a través de la zona de detección reduce la luz incidente sobre el fotodetector y se reduce momentáneamente la salida de voltaje del fotodetector. Los cambios en el voltaje se registran como pulsos eléctricos que se convierten por el instrumento en el número de partículas presentes. El método es no específico y mide las partículas independientemente de su origen. Los tamaños de partícula monitorizados son generalmente de 10 um y 25 um. En el caso de HIAC, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de 6000 partículas de 10 pm por envase (o unidad), en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de 5000, no más de 4000, no más de 3000, no más de 2000, no más de 1000 partículas de 10 pm por envase (o unidad) en comparación con una muestra de control. En otras realizaciones adicionales, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de 600 partículas de 25 um por envase (o unidad) en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica estable debe mostrar no más de 500, no más de 400, no más de 300, no más de 200, no más de 100, no más de 50 partículas de 25 µm por envase (o unidad) en comparación con una muestra de control.

En determinadas realizaciones, la estabilidad de la formulación farmacéutica se mide usando una evaluación visual. La evaluación visual es un método cualitativo usado para describir las características físicas visibles de una muestra. La muestra se observa contra un fondo negro y/o blanco de una cabina de inspección, dependiendo de la característica que se está evaluando (por ejemplo, el color, la claridad, la presencia de partículas o materia extraña). Las muestras también se observan contra un patrón de referencia opalescente y patrones de referencia de color. En el caso de la evaluación visual, una formulación farmacéutica estable no debe mostrar un cambio significativo en el color, la claridad, la presencia de partículas o la materia extraña en comparación con una muestra de control.

Un aspecto de la presente divulgación es una formulación farmacéutica que comprende: (i) de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9; (ii) de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 40 mM de un tampón, tal como acetato de sodio ("NaOAC") que sirve como agente tamponador; (iii) de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de prolina, arginina, lisina, metionina o taurina (también conocida como ácido 2-aminoetanosulfónico) y/o de un 0,5 % a aproximadamente un 5 % de alcohol bencílico que sirve como agente estabilizante; y (iv) de aproximadamente un 0,004 % a aproximadamente un 10 % p/v de la formulación de un tensioactivo no iónico (incluyendo, pero sin limitación, polisorbato-80, polisorbato-60, polisorbato-40 y polisorbato-20); en donde dicha formulación tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,0 a 6,0. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC a aproximadamente 10 mM; (iii) aproximadamente un 0,01 % de

polisorbato 80; y (iv) entre aproximadamente un 2 %-3 % de prolina (o prolina de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 270 mM), en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml del anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, 26H5 y/o 31H4; (ii) NAOAC a aproximadamente 10 mM; (iii) aproximadamente un 0,01 % de polisorbato 80; y (iv) entre aproximadamente un 2 %-3 % de prolina (o prolina de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 270 mM), en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) al menos aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml del anticuerpo anti-PCSK9, 8A3, 11F1 y/o 8A1; (ii) NAOAC a aproximadamente 10 mM; (iii) aproximadamente un 0,01 % de polisorbato 80; y (iv) entre aproximadamente un 2 %-3 % de prolina (o prolina de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 270 mM), en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5.

Un aspecto de la presente divulgación es una formulación farmacéutica que comprende (i) al menos de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM de un tampón, tal como NAOAC; (iii) de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % p/v de la formulación comprende un polihidroxi hidrocarburo, tal como sorbitol o un disacárido, tal como sacarosa; y (iv) de aproximadamente un 0,004 % a aproximadamente un 10 % p/v de la formulación de un tensioactivo, tal como polisorbato 20 o polisorbato 80; en donde dicha formulación tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4,8 a 5,8; y en donde la formulación farmacéutica comprende opcionalmente de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 300 mM de prolina, arginina, lisina, metionina o taurina y/o de un 0,5 % a aproximadamente un 5 % de alcohol bencílico que sirve para reducir la viscosidad. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) de al menos aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml del anticuerpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC a aproximadamente 10 mM; (iii) aproximadamente un 9 % de sacarosa; y (iv) aproximadamente un 0,004 % de polisorbato 20, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,2. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC a aproximadamente 15 mM; (iii) aproximadamente un 9 % de sacarosa; y (iv) aproximadamente un 0,01 % de polisorbato 20, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,2. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC a aproximadamente 20 mM; (iii) aproximadamente un 9 % de sacarosa; y (iv) aproximadamente un 0,01 % de polisorbato 20, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,2. En ciertas realizaciones diferentes, las formulaciones farmacéuticas de esta divulgación comprenden (i) al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo anti-PCSK9; (ii) NAOAC a aproximadamente 10 mM; (iii) aproximadamente un 9 % de sacarosa; (iv) aproximadamente un 0,01 % de polisorbato 80; y (v) prolina aproximadamente 250 mM, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 5.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en terapia combinada, es decir, combinadas con otros agentes. En determinadas realizaciones, la terapia combinada comprende una proteína de unión a antígeno capaz de unirse a PCSK9, en combinación con al menos un agente contra el colesterol. Los agentes incluyen, pero sin limitación, formulaciones químicas preparada sintéticamente *in vitro*, anticuerpos, regiones de unión a antígeno y combinaciones y conjugados de los mismos. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar como un agonista, antagonista, modulador alostérico o toxina. En determinadas realizaciones, un agente puede actuar inhibiendo o estimulando a su diana (por ejemplo, receptor o activador o inhibidor enzimático) y de este modo, promueve el aumento de la expresión de LDLR o la reducción en los niveles séricos de colesterol.

En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 puede administrarse antes de, de manera concurrente con y después del tratamiento con un agente reductor del colesterol (colesterol sérico y/o total). En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 puede administrarse de manera profiláctica para prevenir o mitigar la aparición de hipercolesterolemia, cardiopatía, diabetes y/o cualquiera de los trastornos relacionados con el colesterol. En determinadas realizaciones, puede administrarse una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 para el tratamiento de un estado de hipercolesterolemia existente. En algunas realizaciones, la ABP retrasa la aparición del trastorno y/o los síntomas asociados con el trastorno. En algunas realizaciones, se proporciona la ABP a un sujeto que carece de cualesquiera síntomas de uno cualquiera de los trastornos relacionados con el colesterol o un subconjunto de los mismos.

En determinadas realizaciones, se usa una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 con agentes terapéuticos particulares para tratar diversos trastornos relacionados con el colesterol, tales como hipercolesterolemia. En determinadas realizaciones, en vista de la afección y del nivel de tratamiento deseado, pueden administrarse dos, tres o más agentes. En determinadas realizaciones, dichos agentes pueden proporcionarse juntos mediante su

inclusión en la misma formulación. En determinadas realizaciones, dichos agentes y una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 pueden proporcionarse juntos mediante inclusión en la misma formulación. En determinadas realizaciones, dichos agentes pueden formularse por separado y proporcionarse juntos mediante inclusión en un kit de tratamiento. En determinadas realizaciones, dichos agentes y una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 pueden formularse por separado y proporcionarse juntos mediante inclusión en un kit de tratamiento. En determinadas realizaciones, dichos agentes pueden proporcionarse por separado.

En determinadas realizaciones, puede prepararse para su almacenamiento una formulación que comprende una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, mezclando la formulación seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, anteriormente citado), en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, en ciertas realizaciones, puede formularse una formulación que comprende una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en forma de un liofilizado usando excipientes adecuados.

En determinadas realizaciones, cuando se contempla la administración parenteral, una formulación terapéutica puede encontrarse en forma de una solución acuosa despirogenada parenteralmente aceptable que comprende una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 deseada, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, un vehículo para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en forma de una solución isotónica estéril adecuadamente conservada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden facilitar la liberación controlada o sostenida del producto que se va a suministrar después a través de una inyección de depósito. En determinadas realizaciones, el ácido hialurónico también puede usarse y puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden usarse dispositivos implantables de suministro de fármacos para introducir la molécula deseada.

En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica puede formularse para inhalación. En determinadas realizaciones, puede formularse una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en forma de un polvo seco para inhalación. En determinadas realizaciones, una solución para inhalación que comprende una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, puede formularse con un propulsor para la administración por aerosol. En determinadas realizaciones, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la solicitud PCT n.º PCT/US94/001875, que describe el suministro pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

En determinadas realizaciones, una formulación farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. En determinadas realizaciones, disolviendo los comprimidos en agua estéril u otro vehículo adecuado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. En determinadas realizaciones, los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Serán evidentes formulaciones farmacéuticas adicionales para los expertos en la materia, incluyendo formulaciones que implican proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9, con o sin al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, en formulaciones de suministro sostenido o controlado. En determinadas realizaciones, los expertos en la materia conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tales como portadores liposómicos, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la Solicitud PCT n.º PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para el suministro de formulaciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919 y EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983)), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)), acetato de etilenvinilo (Langer et al., anteriormente citado) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). En determinadas realizaciones, las formulaciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); los documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La formulación farmacéutica para su uso para administración *in vivo* es normalmente estéril. En determinadas realizaciones, esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. En determinadas realizaciones, cuando se liofiliza la formulación, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y la reconstitución. En determinadas realizaciones, la formulación para

administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. En determinadas realizaciones, las formulaciones parenterales normalmente se disponen en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

En determinadas realizaciones, una vez que se ha formulado la formulación farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. En determinadas realizaciones, dichas formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizadas) que se reconstituye antes de la administración.

En determinadas realizaciones, una vez que se ha formulado la formulación farmacéutica, puede almacenarse en jeringas precargadas en forma de una solución o suspensión en una forma lista para usar.

En determinadas realizaciones, se proporcionan kits para producir una unidad de administración monodosis. En determinadas realizaciones, el kit puede contener tanto un primer envase que tiene una proteína desecada como un segundo envase que tiene una formulación acuosa. En determinadas realizaciones, se incluyen kits que contienen jeringas precargadas sencillas y con múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas para líquidos y liojeringas).

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de una formulación farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, que se va a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la materia apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento, de acuerdo con determinadas realizaciones, por tanto variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se está administrando una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal u tamaño del órgano) y/o condición (edad y estado general de salud) del paciente. En determinadas realizaciones, el médico puede valorar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

En determinadas realizaciones, la formulación puede administrarse por vía local mediante el implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el cual se ha encapsulado o absorbido la molécula deseada. En determinadas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado y el suministro de la molécula deseada puede realizarse por difusión, bolo de liberación programada o administración continua.

Dosificación y pautas posológicas

Cualquiera de las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 ilustradas en la tabla 2 y las FIG. 2 y/o 3 pueden administrarse a un paciente de acuerdo con los métodos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 incluyen 21B12, 26H5, 31H4, 8A3, 11F1 u 8A1.

La cantidad de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 (por ejemplo, un anticuerpo anti-PCSK9) administrada a un paciente de acuerdo con los métodos de la presente divulgación es, generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad de ABP puede expresarse en términos de miligramos de anticuerpo (es decir, mg) o miligramos de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del paciente (es decir, mg/kg). En determinadas realizaciones, una dosis típica de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 puede variar de aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más de la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9. En determinadas realizaciones, la dosis puede variar de 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o de 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9; o de 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9; o de 2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9; o de 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9.

En determinadas realizaciones, la cantidad (o dosis) de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 puede variar de al menos aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1400 mg; o de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 1200 mg; o de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 1000 mg; o de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 800 mg; o de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 700 mg; o de aproximadamente 14 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 70 mg hasta aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 90 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 480 mg o de aproximadamente 105 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 110 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 115 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 120 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 125 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 130 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 135 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 140 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 145 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 170 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente

180 mg a aproximadamente 480 mg o de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 480 mg o de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 210 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 220 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 230 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 240 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 260 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 270 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 290 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 310 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 320 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 330 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 340 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 350 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 360 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 370 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 380 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 390 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 410 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 420 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 430 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 440 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 450 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 460 mg a aproximadamente 480 mg; o de aproximadamente 470 mg a aproximadamente 480 mg de proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9.

En determinadas realizaciones, la frecuencia de la dosis tendrá en cuenta los parámetros farmacocinéticos de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 y/o cualquier agente terapéutico adicional en la fórmula usada. En determinadas realizaciones, un profesional médico administrará la formulación hasta que se alcance una dosis que logra el efecto deseado. En determinadas realizaciones, la formulación puede administrarse, por tanto, como una sola dosis o como dos, tres, cuatro o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) con el paso del tiempo o en forma de una infusión continua mediante un dispositivo de implante o catéter. La formulación también puede administrarse por vía subcutánea o intravenosa con una ajuga y jeringa convencional. Además, con respecto a la administración subcutánea, los dispositivos de administración en bolígrafo, así como los dispositivos de administración autoinyectores, tienen aplicaciones en el suministro de una formulación farmacéutica de la presente invención. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada se realiza rutinariamente por los expertos en la materia y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por ellos. En determinadas realizaciones, se pueden determinar las dosis adecuadas mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados. En algunas realizaciones, la cantidad y la frecuencia de administración puede tener en cuenta el nivel de colesterol (sérico y/o total) deseado que se vaya a obtener y el nivel actual de colesterol, el nivel de LDL y/o los niveles de LDLR del sujeto, todos los cuales pueden obtenerse mediante métodos que se conocen bien por los expertos en la materia.

En determinadas realizaciones, una dosis de al menos aproximadamente 10 mg; o hasta aproximadamente 14 mg; o hasta aproximadamente 20 mg; o hasta aproximadamente 35 mg; o hasta aproximadamente 40 mg o hasta aproximadamente 45 mg o hasta aproximadamente 50 mg; o hasta aproximadamente 70 mg de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se administra una vez a la semana (QW) a un paciente que lo necesite.

En algunas realizaciones diferentes, una dosis de al menos aproximadamente 70 mg o hasta aproximadamente 100 mg; o hasta aproximadamente 105 mg o hasta aproximadamente 110 mg; o hasta aproximadamente 115 mg o hasta aproximadamente 120 mg; o hasta aproximadamente 140 mg; o hasta aproximadamente 160 mg; o hasta aproximadamente 200 mg; o hasta aproximadamente 250 mg; o hasta 280 mg; o hasta 300 mg; o hasta 350 mg; o hasta 400 mg; o hasta 420 mg de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se administra en semanas alternas, (o cada dos semanas) (Q2W) a un paciente que lo necesite.

En ciertas realizaciones diferentes, una dosis de al menos aproximadamente 250 mg; o hasta aproximadamente 280 mg; o hasta aproximadamente 300 mg; o hasta aproximadamente 350 mg; o hasta aproximadamente 400 mg; o hasta aproximadamente 420 mg; o hasta aproximadamente 450 mg; o hasta 480 mg de una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se administra una vez cada cuatro semanas, (o una vez al mes), a un paciente que lo necesite.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un

30 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un

85 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 % y la reducción se mantiene durante un periodo de al menos aproximadamente 3 días, al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 28 días o al menos aproximadamente 31 días en relación con un nivel antes de la dosis.

Ciertas aplicaciones terapéuticas

Como apreciará un experto en la materia, los trastornos que están relacionados con, implican o pueden estar influenciados por diversos niveles de colesterol, LDL, LDLR, PCSK9, VLDL-C, apoproteína B ("ApoB"), lipoproteína A ("Lp(a)"), triglicéridos, HDL-C, no-HDL-C y colesterol total pueden abordarse por las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 descritas en la presente invención. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles séricos elevados de colesterol o en los que son relevantes los niveles séricos elevados de colesterol. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con valores elevados de PCSK9 o en los que son relevantes los valores elevados de PCSK9. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles elevados de colesterol total o en los que son relevantes los niveles elevados de colesterol total. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles elevados de colesterol no-HDL o en los que son relevantes los niveles elevados de colesterol no-HDL. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles elevados de ApoB o en los que son relevantes los niveles elevados de ApoB. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles elevados de Lp(a) o en los que son relevantes los niveles elevados de Lp(a). En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles elevados de triglicéridos o en los que son relevantes los niveles elevados de triglicéridos. En un aspecto, pueden usarse proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 para tratar y/o prevenir y/o reducir el riesgo de trastornos que están relacionados con niveles elevados de VLDL-C o en los que son relevantes los niveles elevados de VLDL-C.

En un aspecto, se usa una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 para modular los niveles séricos de colesterol asociado a LDL en un paciente. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para reducir la cantidad de colesterol asociado a LDL a partir de un nivel anormalmente elevado o incluso un nivel normal. En determinadas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En determinadas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En determinadas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En determinadas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 45 %. En determinadas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En determinadas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el nivel sérico de colesterol asociado a LDL se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En un aspecto, una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para modular los valores séricos de PCSK9 en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para reducir los valores de PCSK9 desde un nivel anormalmente elevado o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 85 %. En algunas realizaciones, el valor sérico de PCSK9 se reduce en al menos aproximadamente un 90 %.

En un aspecto, se usa una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 para modular el nivel de colesterol total en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para reducir la cantidad de colesterol total a partir de un nivel anormalmente elevado o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de colesterol total en al menos aproximadamente un 60 %.

En un aspecto, una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para modular el nivel de colesterol no-HDL en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para reducir el colesterol no-HDL a partir de un nivel anormalmente elevado o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 75 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 80 %. En algunas realizaciones, el nivel de colesterol no asociado con HDL se reduce en al menos aproximadamente un 85 %.

En un aspecto, se usa una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 para modular los niveles de ApoB en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para reducir la cantidad de ApoB a partir de un nivel anormalmente elevado o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 65 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 70 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de ApoB en al menos aproximadamente un 75 %.

En un aspecto, se usa una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 para modular los niveles de Lp(a) en un paciente. En determinadas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 es neutralizante. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para reducir la cantidad de Lp(a) a partir de un nivel anormalmente elevado o incluso un nivel normal. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 5 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 10 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 15 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 20 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 25 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 30 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 35 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 40 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 45 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 55 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 60 %. En algunas realizaciones, se reduce el nivel de Lp(a) en al menos aproximadamente un 65 %.

Como apreciará un experto en la materia, las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 de la presente invención pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento y/o la prevención de trastornos relacionados con el colesterol. En algunas realizaciones, un "trastorno relacionado con el colesterol" (que incluye "trastornos relacionados con el colesterol sérico") incluye uno cualquiera o más de los siguientes: hipercolesterolemia familiar,

hipercolesterolemia no familiar, hiperlipidemia, cardiopatía, síndrome metabólico, diabetes, cardiopatía coronaria, ictus, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Alzheimer y en general, dislipidemias, que pueden manifestarse, por ejemplo, por un colesterol sérico total elevado, LDL elevadas, triglicéridos elevados, VLDL elevadas y/o HDL elevadas. Algunos ejemplos no limitantes de dislipidemias primarias y secundarias que pueden tratarse usando una ABP, ya sea sola o en combinación de uno o más agentes incluyen el síndrome metabólico, diabetes mellitus, hiperlipidemia combinada familiar, hipertrigliceridemia familiar, hipercolesterolemias familiares, incluyendo hipercolesterolemia heterocigótica familiar, hipercolesterolemia homocigótica, apolipoproteína B-100 defectuosa familiar; hipercolesterolemia poligénica; disbetalipoproteinemia familiar, deficiencia de lipasa hepática; dislipidemia secundaria a cualquiera de los siguientes: indiscreción dietética, hipotiroidismo, terapia farmacológica que incluye estrógenos y progestina, betabloqueantes y diuréticos de tiazida; síndrome nefrótico, insuficiencia renal crónica, síndrome de Cushing, cirrosis biliar primaria, enfermedades de almacenamiento de glucógeno, hepatoma, colestasis, acromegalia, insulinoma, deficiencia de hormona del crecimiento aislada e hipertrigliceridemia inducida por alcohol. Las ABP también pueden ser útiles a la hora de prevenir o tratar enfermedades ateroescleróticas, tales como, por ejemplo, muerte cardiovascular, muerte no cardiovascular o por cualquier causa, cardiopatía coronaria, arteriopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus (isquémico y hemorrágico), angina de pecho o enfermedad cerebrovascular y síndrome coronario agudo, infarto de miocardio y angina inestable. En algunas realizaciones, la ABP es útil para reducir el riesgo de: ataques cardíacos fatales y no fatales, ictus fatales y no fatales, ciertos tipos de cirugía cardíaca, hospitalización por insuficiencia cardíaca, dolor torácico en pacientes con cardiopatía y/o eventos cardiovasculares causados por una cardiopatía establecida, tal como un ataque cardíaco previo, cirugía cardíaca previa y/o dolor de pecho con evidencias de arterias bloqueadas y/o enfermedad vascular relacionada con trasplantes. En algunas realizaciones, la ABP es útil a la hora de prevenir o reducir el riesgo cardiovascular debido a CRP o hsCRP elevada. En algunas realizaciones, la ABP y los métodos pueden usarse para reducir el riesgo de eventos cardiovasculares recurrentes.

Como apreciará un experto en la materia, las enfermedades o trastornos que generalmente son abordables (ya sea tratables o prevenibles) mediante el uso de estatinas también pueden beneficiarse de la aplicación de las presentes proteínas de unión a antígeno. Además, en algunas realizaciones, los trastornos o enfermedades que pueden beneficiarse de la prevención de la síntesis de colesterol o de la expresión aumentada de LDLR también pueden tratarse mediante diversas realizaciones de las proteínas de unión a antígeno. Además, como apreciará un experto en la materia, el uso de los anticuerpos anti-PCSK9 puede ser especialmente útil en el tratamiento de la diabetes. No solo la diabetes es un factor de riesgo para la cardiopatía coronaria, sino que la insulina aumenta la expresión de PCSK9. Es decir, la gente con diabetes tiene niveles plasmáticos de lípidos elevados (que pueden estar relacionados con altos niveles de PCSK9) y puede beneficiarse de la reducción de estos niveles. Esto se analiza generalmente en más detalle en Costet et al. ("Hepatic PCSK9 Expression is Regulated by Nutritional Status via Insulin and Sterol Regulatory Element-binding Protein 1C", J. Biol. Chem., 281: 6211-6218, 2006).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se administra a aquellos que tienen diabetes mellitus, aneurisma aórtico abdominal, ateroesclerosis y/o arteriopatía periférica a fin de reducir sus niveles séricos de colesterol hasta un intervalo más seguro. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno se administra a pacientes en riesgo de desarrollar cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, las ABP se administran a sujetos que fuman o que fumaban (es decir, exfumadores), tienen hipertensión o un historial familiar de ataques cardíacos tempranos.

En algunas realizaciones, se administra a un sujeto una ABP si se encuentran a un riesgo moderado o mayor en los objetivos de tratamiento NCEP de 2004. En algunas realizaciones, la ABP se administra a un sujeto en caso de que el nivel de colesterol asociado a LDL del sujeto sea mayor de 160 mg/dl. En algunas realizaciones, la ABP se administra si el nivel de colesterol asociado a LDL del sujeto es mayor de 130 (y tiene un riesgo moderado o moderadamente elevado de acuerdo con los objetivos de tratamiento NCEP de 2004). En algunas realizaciones, la ABP se administra si el nivel de colesterol asociado a LDL del sujeto es mayor de 100 (y tiene un riesgo elevado o muy elevado de acuerdo con los objetivos de tratamiento NCEP de 2004). En algunas realizaciones, la ABP se administra si el nivel de colesterol asociado a LDL del sujeto es mayor de 80 mg/dl. En algunas realizaciones, la ABP se administra si el nivel de colesterol asociado a LDL del sujeto es mayor de 70 mg/dl.

Un médico será capaz de seleccionar las indicaciones de tratamiento adecuadas y los niveles de lípido diana dependiendo del perfil individual de un paciente particular. Un estándar bien aceptado para guiar el tratamiento de la hiperlipidemia es el Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of the High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report, National Institutes of Health, Publicación del NIH n.º 02-5215 (2002).

En algunas realizaciones, las proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 se usan para tratar o prevenir la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia o la dislipidemia y/o en la preparación de medicamentos de las mismas y/o para otros trastornos relacionados con el colesterol (tales como los indicados en el presente documento). En determinadas realizaciones, una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 se usa para tratar o prevenir afecciones, tales como hipercolesterolemia, en las que la actividad de PCSK9 es normal. En dichas afecciones, por ejemplo, la reducción de la actividad de PCSK9 por debajo de lo normal puede proporcionar un efecto terapéutico.

Terapias combinadas

En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un trastorno relacionado con el colesterol, tales como hipercolesterolemia, hiperlipidemia o dislipidemia, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9 y otro agente terapéutico. En determinadas realizaciones, se administra una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 antes de la administración de al menos un agente terapéutico distinto. En determinadas realizaciones, se administra una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 de manera concurrente con la administración de al menos un agente terapéutico distinto. En determinadas realizaciones, se administra una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 después de la administración de al menos un agente terapéutico distinto.

Los agentes terapéuticos (aparte de la proteína de unión a antígeno), incluyen, pero sin limitación, al menos otro agente reductor del colesterol (colesterol sérico y/o total en el organismo). En algunas realizaciones, el agente aumenta la expresión de LDLR, se ha observado que aumenta los niveles séricos de HDL, reduce los niveles de LDL o reduce los niveles de triglicéridos. Los agentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, estatinas (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, simvastatina), ácido nicotínico (Niacina) (NIACOR, NIASPAN (niacina de liberación lenta), SLO-NIACIN (niacina de liberación lenta), CORDAPTIVE (laropiprant)), ácido fíbrico (LOPID (Gemfibrozil), TRICOR (fenofibrato), secuestrantes de sales biliares (QUESTRAN (colestiramina), colesevelam (WELCHOL), COLESTID (colestipol)), inhibidores de la absorción de colesterol (ZETIA (ezetimibe)), combinación de ácido nicotínico con estatina (ADVICOR (LOVASTATINA y NIASPAN), combinación de una estatina con un inhibidor de la absorción (VYTORIN (ZOCOR y ZETIA) y/o agentes modificadores de lípidos. En algunas realizaciones, la ABP se combina con agonistas de PPAR gamma, agonistas de PPAR alfa/gamma, inhibidores de escualeno sintasa, inhibidores de CETP, antihipertensivos, agentes antidiabéticos (tales como sulfonilureas, insulina, análogos de GLP-1, inhibidores de DDPIV, por ejemplo, metformina), moduladores de ApoB, tales como mipomersan, inhibidores de MTP y/o tratamientos contra la arterioesclerosis obliterante. En algunas realizaciones, la ABP se combina con un agente que aumenta el nivel de proteína LDLR en un sujeto, tal como estatinas, ciertas citocinas, tales como oncostatina M, estrógenos y/o ciertos ingredientes herbales, tales como berberina. En algunas realizaciones, la ABP se combina con un agente que aumenta los niveles séricos de colesterol en un sujeto (tal como ciertos agentes antipsicóticos, ciertos inhibidores de la proteasa del VIH, factores dietéticos, tales como alta fructosa, sacarosa, colesterol o ciertos ácidos grasos y ciertos agonistas y antagonistas de receptor nuclear para RXR, RAR, LXR, FXR). En algunas realizaciones, la ABP se combina con un agente que aumenta el nivel de PCSK9 en un sujeto, tales como estatinas y/o insulina. La combinación de los dos puede permitir mitigar los efectos secundarios no deseables de otros agentes mediante la ABP.

En determinadas realizaciones, puede usarse una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 con al menos un agente terapéutico para la inflamación. En determinadas realizaciones, puede usarse una proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 con al menos un agente terapéutico para un trastorno inmunitario. Los agentes terapéuticos ejemplares para la inflamación y los trastornos inmunitarios incluyen, pero sin limitación, inhibidores de ciclooxigenasa de tipo 1 (COX-1) y ciclooxigenasa de tipo 2 (COX-2), moduladores de molécula pequeña de la proteína cinasa activada por mitógeno de 38 kDa (p38-MAPK); moduladores de molécula pequeña de moléculas intracelulares implicadas en las vías de la inflamación, en donde dichas moléculas intracelulares incluyen, pero sin limitación, jnk, IKK, NF-κB, ZAP70 y lck. Se describen ciertos agentes terapéuticos ejemplares para la inflamación, por ejemplo, en C.A. Dinarello y L.L. Moldawer Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians Third Edition (2001) Amgen Inc. Thousand Oaks, CA.

Aplicaciones diagnósticas

En algunas realizaciones, la ABP se usa como una herramienta de diagnóstico. La ABP puede usarse para evaluar la cantidad de PCSK9 presente en una muestra y/o sujeto. Como apreciará un experto en la materia, dichas ABP no son necesariamente ABP neutralizantes. En algunas realizaciones, la ABP de diagnóstico no es una ABP neutralizante. En algunas realizaciones, la ABP de diagnóstico se une a un epítopo diferente al que se une la ABP neutralizante. En algunas realizaciones, las dos ABP no compiten entre sí.

En algunas realizaciones, las ABP divulgadas en el presente documento se usan o proporcionan en un kit y/o método de ensayo para la detección de PCSK9 en tejidos o células de mamífero para detectar de manera sistemática/diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con cambios en los niveles de PCSK9. El kit comprende una ABP que se une a PCSK9 y medios para indicar la unión de la ABP con PCSK9, en caso de estar presente y opcionalmente los niveles de proteína PCSK9. Pueden usarse diversos medios para indicar la presencia de una ABP. Por ejemplo, pueden ligarse fluoróforos, otras sondas moleculares o enzimas a la ABP y puede observarse la presencia de la ABP de diversas maneras. El método de detección sistemática de dichos trastornos puede implicar el uso del kit o sencillamente, el uso de una de las ABP divulgadas y la determinación de si la ABP se une a PCSK9 en una muestra. Como apreciará un experto en la materia, los niveles altos o elevados de PCSK9 darán como resultado mayores cantidades de unión de la ABP a PCSK9 en la muestra. Por tanto, puede usarse el grado de unión de la ABP para determinar qué cantidad de PCSK9 hay en la muestra. Puede caracterizarse que los sujetos o muestras con una cantidad de PCSK9 que es mayor que una cantidad predeterminada (por ejemplo, una cantidad o intervalo que tendría una persona sin un trastorno relacionado con PCSK9) tienen un trastorno mediado por PCSK9. En algunas

realizaciones, la ABP se administra a un sujeto que está tomando una estatina, a fin de determinar si la estatina ha aumentado la cantidad de PCSK9 en el sujeto.

En algunas realizaciones, la ABP es una ABP no neutralizante y se usa para determinar la cantidad de PCSK9 en un sujeto que recibe un tratamiento con ABP y/o estatina.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes, incluyendo los experimentos llevados a cabo y los resultados logrados, se proporcionan con fines únicamente ilustrativos y no han de interpretarse como limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1

Inmunización y titulación

Generación de anticuerpos anti-PCSK9 e hibridomas

Se produjeron anticuerpos contra la forma madura de PCSK9 (representada como la secuencia en la FIG. 1A, con el prodominio subrayado) en ratones XenoMouse® (Abgenix, Fremont, CA), que son ratones que contienen genes de inmunoglobulina humana. Se usaron dos grupos de ratones XenoMouse®, grupo 1 y 2, para producir anticuerpos dirigidos contra PCSK9. El grupo 1 incluyó ratones de la estirpe XenoMouse® XMG2-KL, que produce anticuerpos $IgG2_K$ e IgG2X completamente humanos. Los ratones del grupo 1 se inmunizaron con PCSK9 humana. Se preparó PCSK9 usando técnicas de recombinación estándar usando la secuencia de GenBank como referencia (NM_174936). El grupo 2 implicó ratones de la estirpe XenoMouse® XMG4-KL, que producen anticuerpos $IgG4_K$ e IgG4λ completamente humanos. Los ratones del grupo 2 también se inmunizaron con PCSK9 humana.

Se inyectó antígeno a los ratones de ambos grupos once veces, de acuerdo con la pauta en la tabla 3. En las inmunizaciones iniciales, se inyectó a cada ratón un total de 10 µg de antígeno administrado por vía intraperitoneal en el abdomen. Los refuerzos posteriores son dosis de 5ug y el método de inyección se alterna entre inyecciones intraperitoneales en el abdomen e inyecciones subcutáneas en la base de la cola. Para las inyecciones intraperitoneales, el antígeno se prepara en forma de emulsión con TiterMax® Gold (Sigma, n.º de cat. T2684) y para las inyecciones subcutáneas el antígeno se mezcla con alumbre (fosfato de aluminio) y oligos de CpG. En las inyecciones 2 a 8 y 10, se inyectó a cada ratón un total de 5 µg de antígeno en el adyuvante de gel de alumbre. Se administró una inyección final de 5 µg de antígeno por ratón en suero salino tamponado con fosfato y se administra en 2 sitios al 50 % IP en el abdomen y al 50 % SQ en la base de la cola. Los programas de inmunización se resumen en la tabla 3, mostrada a continuación.

TABLA 3

estirpe de ratón	XMG2/kl	XMG4/kl
n.º de animales	10	10
inmunógeno	PCSK9-V5/His	PCSK9-V5/His
1.er refuerzo	inyección IP, 10ug cada una	inyección IP, 10uq cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
2.º refuerzo	inyección en la cola, 5ug cada una	inyección en la cola, 5ug cada una
	Alumbre/CpG ODN	Alumbre/CpG ODN
3.er refuerzo	inyección IP, 5ug cada una	inyección IP, 5ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
4.º refuerzo	inyección en la cola, 5ug cada una	inyección en la cola, 5ug cada una
	Alumbre/CpG ODN	Alumbre/CpG ODN

(continuación)

estirpe de ratón	XMG2/kl	XMG4/kl
n.º de animales	10	10
5.º refuerzo	inyección IP, 5ug cada una	inyección IP, 5ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
6.º refuerzo	inyección en la cola, 5ug cada una	inyección en la cola, 5ug cada una
	Alumbre/CpG ODN	Alumbre/CpG ODN
7.º refuerzo	inyección IP, 5ug cada una	inyección IP, 5ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
8.º refuerzo	inyección en la cola, 5ug cada una	inyección en la cola, 5ug cada una
	Alumbre/CpG ODN	Alumbre/CpG ODN
sangrado		
9.º refuerzo	inyección IP, 5ug cada una	inyección IP, 5ug cada una
	Titermax Gold	Titermax Gold
10.º refuerzo	inyección en la cola, 5ug cada una	inyección en la cola, 5ug cada una
	Alumbre/CpG ODN	Alumbre/CpG ODN
11.º refuerzo	BIP, 5ug cada una	BIP, 5ug cada una
	PBS	PBS
recogida		

El protocolo usado para valorar los animales XenoMouse fue como sigue: Se recubrieron placas de unión media Costar 3368 con neutravidina a 8ug/ml (50ul/pocillo) y se incubaron a 4 °C en 1XPBS/azida al 0,05 % durante una noche. Se lavaron usando lavado TiterTek de 3 ciclos con agua RO. Las placas se bloquearon usando 250ul de 1XPBS/leche al 1 % y se incubaron durante al menos 30 minutos a TA. El bloque se lavó usando lavado TiterTek de 3 ciclos con agua RO. Después se capturó b-PCSK9 humana a 2ug/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM (diluyente de ensayo) 50ul/pocillo y se incubó durante 1h a TA. Después se lavaron usando lavado TiterTek de 3 ciclos con agua RO. Para el anticuerpo primario, los sueros se valoraron a 1:3 por duplicado a partir de 1:100. Esto se llevó a cabo en diluyente de ensayo a 50ul/pocillo y se incubó durante 1 h a TA. Después se lavaron usando lavado TiterTek de 3 ciclos con agua RO. El anticuerpo secundario fue anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-HRP a 400 ng/ml en diluyente de ensayo a 50ul/pocillo. Esto se incubó durante 1h a TA. Esto se lavó después usando lavado TiterTek de 3 ciclos con agua RO y se secó golpeando suavemente sobre toallitas de papel. Para el sustrato, se usó solución TMB en una etapa (Neogen, Lexington, Kentucky) (50ul/pocillo) y se dejó revelar durante 30 min a TA.

Los protocolos seguidos en el ELISA fueron como se indica a continuación: Para las muestras que comprendían b-PCSK9 sin marcador V5His, se empleó el siguiente protocolo: Se emplearon placas de unión media Costar 3368 (Corning Life Sciences). Las placas se recubrieron con neutravidina a 8 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, (50 µl/pocillo). Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek M384 (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 250 µl de 1XPBS/leche al 1 % y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas M384. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. La captura fue b-PCSK9 humana, sin un marcador V5 y se añadió a 2 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM (40 µl/pocillo). Después, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Los sueros se valoraron a 1:3 por duplicado a partir de 1:100 y la fila H se dejó en blanco para suero. La valoración se llevó a cabo en diluyente de ensayo, en un volumen de 50 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Se añadió anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-HRP a 100 ng/ml (1:4000) en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM (50 µl/pocillo) a la placa y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente, usando un lavado de 3 ciclos. Después, las placas se

secaron golpeándolas suavemente con una toallita de papel. Finalmente, se añadió TMB en 1 etapa (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 µl/pocillo) a la placa y se inactivó con ácido clorhídrico 1 N (50 µl/pocillo) después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek.

Los controles positivos para detectar PCSK9 unida a la placa fueron receptor de LDL (R&D Systems, n.º de cat. 2148LD/CF) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-PCSK9 (Caymen Chemical, n.º 10007185) valorado a 1:3 por duplicado a partir de 3 µg/ml en diluyente de ensayo. El LDLR se detectó con anticuerpo de cabra anti-LDLR (R&D Systems, n.º de cat. AF2148) y anticuerpo de conejo anti-Fc de IgG de cabra-HRP a una concentración de 400 ng/ml; el anticuerpo policlonal de conejo se detectó con anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de conejo a una concentración de 400 ng/ml en diluyente de ensayo. El control negativo fueron sueros XMG2-KL y XMG4-KL vírgenes valorados a 1:3 por duplicado a partir de 1:100 en diluyente de ensayo.

Para las muestras que comprendían b-PCSK9 con un marcador V5His, se empleó el siguiente protocolo: Se emplearon placas de unión media Costar 3368 (Corning Life Sciences). Las placas se recubrieron con neutravidina a 8 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, (50 µl/pocillo). Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek M384 (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 250 µl de 1XPBS/leche al 1 % y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas M384. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. La captura fue b-PCSK9 humana, con un marcador V5 y se añadió a 2 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM (40 µl/pocillo). Después, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Los sueros se valoraron a 1:3 por duplicado a partir de 1:100 y la fila H se dejó en blanco para suero. La valoración se llevó a cabo en diluyente de ensayo, en un volumen de 50 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron usando el lavador de placas M384 accionado usando un lavado de 3 ciclos. Se añadió anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-HRP a 400 ng/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM a 50 µl/pocillo a la placa y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente, usando un lavado de 3 ciclos. Después, las placas se secaron golpeándolas suavemente con una toallita de papel. Finalmente, se añadió TMB en 1 etapa (Neogen, Lexington, Kentucky) (50 µl/pocillo) a la placa y la placa se inactivó con ácido clorhídrico 1 N (50 µl/pocillo) después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek.

El control positivo fue LDLR, anticuerpo de conejo anti-PCSK9 valorado a 1:3 por duplicado a partir de 3 µg/ml en diluyente de ensayo. LDLR se detecta con anticuerpo de cabra anti-LDLR (R&D Systems, n.º de cat. AF2148) y anticuerpo de conejo anti-Fc de IgG de cabra-HRP a una concentración de 400 ng/ml; el anticuerpo policlonal de conejo se detectó con anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de conejo a una concentración de 400 ng/ml en diluyente de ensayo. Los anticuerpos anti-His 1.2.3 y anti-V5 1.7.1 se valoraron a 1:3 por duplicado a partir de 1 µg/ml en diluyente de ensayo; ambos se detectaron con anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-HRP a una concentración de 400 ng/ml en diluyente de ensayo. El control negativo fueron sueros XMG2-KL y XMG4-KL vírgenes valorados a 1:3 por duplicado a partir de 1:100 en diluyente de ensayo.

Los títulos del anticuerpo contra PCSK9 humana se evaluaron mediante ensayo ELISA para ratones inmunizados con antígeno soluble como se ha descrito. La tabla 4 resume los datos de ELISA e indica que hubo algunos ratones que parecieron ser específicos para PCSK9. Véase, por ejemplo, la tabla 4. Por tanto, al final del programa de inmunización, se seleccionaron 10 ratones (en negrita en la tabla 4) para la recogida y se aislaron esplenocitos y linfocitos de los bazos y ganglios linfáticos, respectivamente, como se describe en el presente documento.

TABLA 4

Resumen de resultados del ELISA			
		Título	**Título**
ID del animal		b-PCSK9 hu (V5His) a 2ug/ml	b-PCSK9 hu a 2ug/ml
Grupo 1 - IgG2k/l	P175807	>72900 a DO 2,2	68359
	P175808	>72900 a DO 2,3	>72900 a DO 2,5
	P175818	>72900 a DO 3,2	>72900 a DO 3,0
	P175819	>72900 a DO 3,4	>72900 a DO 3,2
	P175820	>72900 a DO 2,4	>72900 a DO 2,5
	P175821	>72900 a DO 3,4	>72900 a DO 3,0
	P175830	>72900 a DO 2,6	>72900 a DO 2,5
	P175831	>72900 a DO 3,1	>72900 a DO 3,1
	P175832	>72900 a DO 3,8	>72900 a DO 3,6
	P175833	>72900 a DO 2,6	>72900 a DO 2,3

(continuación)

Resumen de resultados del ELISA			
		Título	**Título**
ID del animal		b-PCSK9 hu (V5His) a 2ug/ml	b-PCSK9 hu a 2ug/ml
Grupo 2 - IgG4k/l	P174501	19369	17109
	P174503	31616	**23548**
	P174508	48472	**30996**
	P174509	23380	21628
	P174510	15120	9673
	P175773	19407	15973
	P175774	54580	**44424**
	P175775	60713	**55667**
	P175776	30871	**22899**
	P175777	16068	12532
	G2 sin tratamiento	< 100 a DO 0,54	< 100 a DO 0,48
	G4 sin tratamiento	< 100 a DO 1,57	< 100 a DO 1,32

EJEMPLO 2

Recuperación de linfocitos, aislamiento de linfocitos B, fusiones y generación de hibridomas

Este ejemplo explica cómo se recuperaron las células inmunitarias y se generaron los hibridomas. Se sacrificó a ratones inmunizados seleccionados mediante dislocación cervical y se recogieron los ganglios linfáticos drenantes y se agruparon de cada cohorte. Los linfocitos B se disociaron del tejido linfático mediante trituración en DMEM para liberar las células de los tejidos y las células se suspendieron en DMEM. Se contaron las células y se añadieron 0,9 ml de DMEM por cada 100 millones de linfocitos al sedimento celular para resuspender cuidadosa pero completamente las células.

Los linfocitos se mezclaron con células de mieloma P3X63Ag8.653 no secretoras adquiridas de la ATCC, n.º de cat. CRL 1580 (Kearney *et al.*, (1979) J. Immunol. 123, 1548-1550) a una relación de 1:4. La mezcla de células se sedimentó cuidadosamente mediante centrifugación a 400 x g 4 min. Tras decantar el sobrenadante, se mezclaron cuidadosamente las células usando una pipeta de 1 ml. Se añadió lentamente solución de PEG/DMSO precalentada de Sigma (n.º de cat. P7306) (1 ml por cada millón de linfocitos B) con agitación suave durante 1 min, seguido de 1 min de mezclado. Después, se añadió I DMEM precalentado (2 ml por cada millón de linfocitos B) (DMEM sin glutamina, L-glutamina, pen/strep, aminoácidos no esenciales MEM (todos de Invitrogen), a lo largo de 2 minutos con agitación suave. Finalmente, se añadió IDMEM precalentado (8 ml por cada 10^6 linfocitos B) a lo largo de 3 minutos.

Las células fusionadas se sedimentaron por centrifugación a 400 x g 6 min y se resuspendieron en 20 ml de medio de selección (DMEM (Invitrogen), FBS al 15 % (Hyclone), suplementado con L-glutamina, pen/strep, aminoácidos no esenciales MEM, piruvato de sodio, 2-mercaptoetanol (todos de Invitrogen), HA-azaserina hipoxantina y OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (ambos de sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim)) por cada millón de linfocitos B. Las células se incubaron durante 20-30 min a 37C y después se resuspendieron en 200 ml de medio de selección y se cultivaron durante 3-4 días en un matraz T175 antes de emplacarlas en 96 pocillos. Por tanto, se produjeron hibridomas que producían proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9.

EJEMPLO 3

Selección de anticuerpos contra PCSK9

El presente ejemplo explica cómo se caracterizaron y seleccionaron las diversas proteínas de unión a antígeno dirigidas contra PCSK9. Se evaluó la unión de anticuerpos seleccionados (producidos por los hibridomas producidos en los ejemplos 1 y 2) dirigidos contra PCSK9. La selección de anticuerpos se basó en datos de unión e inhibición de la unión de PCSK9 a LDLR y la afinidad. La unión a PCSK9 soluble se analizó mediante ELISA, como se describe a continuación. Se usó BIAcore® (resonancia de plasmón superficial) para cuantificar la afinidad de unión.

Exploración primaria

Se llevó a cabo una exploración primaria para anticuerpos que se unen a PCSK9 de tipo silvestre. La exploración primaria se llevó a cabo en dos recogidas. La exploración primaria comprendió un ensayo ELISA y se llevó a cabo usando el siguiente protocolo: Se emplearon placas de unión media Costar 3702 de 384 pocillos (Corning Life

Sciences). Las placas se recubrieron con neutravidina a una concentración de 4 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, en un volumen de 40 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 90 µl de 1XPBS/leche al 1% y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron las placas. De nuevo, se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue PCSK9 biotinilado, sin un marcador V5 y se añadió a 0,9 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM en un volumen de 40 µl/pocillo. Después, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 10 µl de sobrenadante a 40 µl de 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, las placas se lavaron usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-POD a una concentración de 100 ng/ml (1:4000) en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente, usando un lavado de 3 ciclos. Finalmente, se añadieron a la placa 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) y se inactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek.

La exploración primaria dio como resultado un total de 3104 hibridomas específicos de antígeno que se identificaron de las dos recogidas. Basándose en la DO de ELISA más elevada, se avanzaron 1500 hibridomas por recogida hasta un total de 3000 positivos.

Detección sistemática de confirmación

Los 3000 positivos se volvieron a detectar de manera sistemática respecto de su unión a PCSK9 de tipo silvestre para confirmar que se habían establecido hibridomas estables. La detección sistemática se llevó a cabo del siguiente modo: Se emplearon placas de unión media Costar 3702 de 384 pocillos (Corning Life Sciences). Las placas se recubrieron con neutravidina a 3 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, en un volumen de 40 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 90 µl de 1XPBS/leche al 1% y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas M384. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue b-PCSK9, sin un marcador V5 y se añadió a 0,9 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM en un volumen de 40 µl/pocillo. Después, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron usando un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 10 µl de sobrenadante a 40 µl de 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Nuevamente, las placas se lavaron usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-POD a una concentración de 100 ng/ml (1:4000) en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente, usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. Finalmente, se añadieron a la placa 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) y se inactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek. Un total de 2441 positivos se repitieron en la segunda detección sistemática. Después se usaron estos anticuerpos en las detecciones sistemáticas posteriores.

Detección sistemática de reactividad cruzada de ratón

Después, se cribó el panel de hibridomas respecto de su reactividad cruzada con PCSK9 de ratón para garantizar que los anticuerpos podían unirse a PCSK9 tanto humana como de ratón. Se empleó el siguiente protocolo en la detección sistemática de la reactividad cruzada: Se emplearon placas de unión media Costar 3702 de 384 pocillos (Corning Life Sciences). Las placas se recubrieron con neutravidina a 3 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, en un volumen de 40 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 90 µl de 1XPBS/leche al 1% y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue PCSK9 de ratón biotinilada y se añadió a 1 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM a un volumen de 40 µl/pocillo. Después, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante a las placas y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo, se lavaron las placas usando un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-POD a una concentración de 100 ng/ml (1:4000) en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente, usando un lavado de 3 ciclos. Finalmente, se añadieron a la placa 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) y se inactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek. Se observó que 579 anticuerpos reaccionaban de manera cruzada con PCSK9 de ratón. Después se usaron estos anticuerpos en las detecciones sistemáticas posteriores.

Exploración de unión del mutante D374Y

Se ha documentado la mutación D374Y en PCSK9 en la población humana (por ejemplo, Timms KM et al., "A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree", Hum. Genet. 114: 349-353, 2004). A fin de determinar si los anticuerpos eran específicos para el tipo silvestre o también se unían a la forma D374Y de PCSK9, se detectaron sistemáticamente las muestras respecto de su unión a la secuencia mutante de PCSK9 que comprende la mutación D374Y. El protocolo para la detección sistemática fue el siguiente: Se emplearon placas de unión media Costar 3702 de 384 pocillos (Corning Life Sciences) en la detección sistemática. Las placas se recubrieron con neutravidina a 4 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, en un volumen de 40 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 90 µl de 1XPBS/leche al 1% y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se recubrieron con PCSK9 D374Y humana biotinilada a una concentración de 1 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. El sobrenadante de cultivo de hibridoma de salida tardío se diluyó a 1:5 en PBS/leche/Ca^{2+} (10 ml más 40 ml) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se valoraron sobre las placas 40 µl/pocillo de anticuerpo de conejo anti-PCSK9 humana (Cayman Chemical) y humano anti-His 1.2.3 1:2 a 1ug/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM, que después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Se añadieron 40 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana-HRP a una concentración de 100 ng/ml (1:4000) en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron 40 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG de conejo-HRP a una concentración de 100 ng/ml (1:4000) en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Finalmente, se añadieron a la placa 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) y se inactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek. Más de un 96 % de los positivos sobre PCSK9 de tipo silvestre también se unieron a PCSK9 mutante.

Detección sistemática de bloqueo a ligando de receptor a gran escala

Para detectar de manera sistemática los anticuerpos que bloquean la unión de PCSK9 a LDLR, se desarrolló un ensayo usando el mutante D374Y de PCSK9. Para este ensayo se usó el mutante debido a que tiene una mayor afinidad de unión a LDLR, lo que permite el desarrollo de un ensayo de bloqueo de ligando de receptor más sensible. Se empleó el siguiente protocolo en la detección sistemática de bloqueo de ligando de receptor: Se emplearon placas de unión media Costar 3702 de 384 pocillos (Corning Life Sciences) en la detección sistemática. Las placas se recubrieron con anticuerpo de cabra anti-LDLR (R&D, n.º de cat. AF2148) a 2 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 % en un volumen de 40 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 90 µl de 1XPBS/leche al 1 % y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. La muestra de captura fue LDLR (R&D, n.º de cat. 2148LD/CF) y se añadió a 0,4 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM en un volumen de 40 µl/pocillo. Después, se incubaron las placas durante 1 hora y 10 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se incubaron 20 ng/ml de PCSK9 D374Y humana biotinilada con 15 microlitros de sobrenadante de salida de hibridoma en placas de polipropileno Nunc y se diluyó la concentración de sobrenadante de salida a 1:5. Después, se preincubaron las placas durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. se transfirieron 50 µl/pocillo de la mezcla preincubada sobre las placas de ELISA recubiertas con LDLR y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Para detectar b-PCSK9 unida a LDLR, se añadieron a las placas 40 µl/pocillo de estreptavidina-HRP a 500 ng/ml en diluyente de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. De nuevo, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Finalmente, se añadieron a la placa 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) y se inactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek. La detección sistemática identificó 384 anticuerpos que bloqueaban bien la interacción entre PCSK9 y el LDLR, 100 anticuerpos bloquearon fuertemente la interacción (DO < 0,3). Estos anticuerpos inhibieron la interacción de unión de PCSK9 y LDLR en más de un 90 % (inhibición mayor del 90 %).

Ensayo de unión a ligando de receptor en el subconjunto bloqueante

Después, se repitió el ensayo de ligando de receptor usando la enzima mutante en el subconjunto de 384 miembros de neutralizadores identificado en el primer ensayo de inhibición de ligando de receptor a gran escala. Se empleó el mismo protocolo en la detección sistemática del subconjunto de bloqueadores de 384 miembros y se llevó a cabo en la detección sistemática de bloqueo de ligando de receptor a gran escala. Esta detección sistemática repetida confirmó los datos de la detección sistemática inicial.

Esta detección sistemática del subconjunto de 384 miembros identificó 85 anticuerpos que bloquearon la interacción entre la enzima PCSK9 mutante y el LDLR en más de un 90 %.

Ensayo de unión a ligando de receptor de bloqueantes que se unen a PCSK9 de tipo silvestre pero no a la mutante D374Y

En el panel inicial de 3000 candidatos principales había 86 anticuerpos que mostraron que se unían específicamente a la PCSK9 de tipo silvestre y no al mutante huPCSK9(D374Y). Estos 86 candidatos principales se ensayaron respecto de su capacidad para bloquear la unión de PCSK9 de tipo silvestre al receptor LDLR. Se empleó el siguiente protocolo: Se emplearon placas de unión media Costar 3702 de 384 pocillos (Corning Life Sciences) en la detección sistemática. Las placas se recubrieron con anti-His 1.2.3 a 10 µg/ml en 1XPBS/azida al 0,05 %, en un volumen de 40 µl/pocillo. Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek (Titertek, Huntsville, AL). Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Las placas se bloquearon con 90 µl de 1XPBS/leche al 1% y se incubaron aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Se añadió LDLR (R&D Systems, n.º 2148LD/CF o R&D Systems, n.º 2148LD) a 5 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM a un volumen de 40 µl/pocillo. Después, se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron usando el lavador de placas Titertek accionado usando un lavado de 3 ciclos. Al mismo tiempo, se preincubó PCSK9 humana de tipo silvestre biotinilada con sobrenadante de salida de hibridoma en placas de polipropileno Nunc. Se transfirieron 22 µl de sobrenadante de hibridoma a 33ul de b-PCSK9 a una concentración de 583 ng/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca^{2+} 10 mM, proporcionando una concentración final de b-PCSK9 = 350 ng/ml y el sobrenadante de salida a una dilución final de 1:2,5. Las placas se preincubaron durante aproximadamente 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron 50 µl/pocillo de la mezcla preincubada sobre placas de ELISA con LDLR capturado y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando el lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. se añadieron a las placas 40 µl/pocillo de estreptavidina HRP a 500 ng/ml en diluyente de ensayo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se lavaron las placas usando un lavador de placas Titertek. Se llevó a cabo un lavado de 3 ciclos. Finalmente, se añadieron a la placa 40 µl/pocillo de One-step TMB (Neogen, Lexington, Kentucky) y se inactivó con 40 µl/pocillo de ácido clorhídrico 1 N después de 30 minutos a temperatura ambiente. Las DO se leyeron inmediatamente a 450 nm usando un lector de placas Titertek.

Resultados de la detección sistemática

Basándose en los resultados de los ensayos descritos, se identificaron varias líneas de hibridoma que producían anticuerpos con interacciones deseadas con PCSK9. Se usó dilución limitante para aislar un número manejable de clones de cada línea. Los clones se denominaron según el número de la línea de hibridoma (por ejemplo, 21B12) y el número de clon (por ejemplo, 21B12.1). En general, no se detectaron diferencias entre los diferentes clones de una línea particular mediante los ensayos funcionales descritos en el presente documento. En unos pocos casos, se identificaron clones de una línea particular que se comportaron de un modo distinto en los ensayos funcionales, por ejemplo, se observó que 25A7.1 no bloqueaba PCSK9/LDLR pero 25A7.3 (citado en el presente documento como 25A7) era neutralizante. Se expandió cada uno de los clones en 50-100 ml de medio de hibridoma y se les dejó crecer hasta su agotamiento, (es decir, una viabilidad celular menor de aproximadamente un 10 %). Se determinó la concentración y la potencia de los anticuerpos dirigidos contra PCSK9 en los sobrenadantes de estos cultivos mediante ELISA y mediante ensayos funcionales *in vitro*, como se describe en el presente documento. Como resultado de la detección sistemática descrita en el presente documento, se identificaron los hibridomas con el mayor título de anticuerpos dirigidos contra PCSK9. Los hibridomas seleccionados se muestran en las FIG. 2A-3D y la tabla 2.

EJEMPLO 4.1

Producción de anticuerpos IgG4 31H4 humanos a partir de hibridomas

Este ejemplo describe de manera general cómo se produjo una de las proteínas de unión a antígeno a partir de una línea de hibridoma. El trabajo de producción usó 50 ml de sobrenadante agotado generado seguido de purificación de proteína A. La producción en Integra fue para el aumento de la escala y se llevó a cabo posteriormente. Se cultivó la línea de hibridoma 31H4 en matraces T75 en 20 ml de medio (Medio Integra, tabla 5). Cuando el hibridoma era prácticamente confluente en los matraces T75, se transfirió a un matraz Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, n.º de cat. 90 005).

El matraz Integra es un matraz de cultivo celular que está dividido por medio de una membrana en dos cámaras, una cámara pequeña y una cámara grande. Se dispuso un volumen de 20-30 ml de células de hibridoma a una densidad celular mínima de $1x10^6$ células por ml de la línea de hibridoma 31H4 en la cámara pequeña de un matraz Integra en medio Integra (véase la tabla 5 para los componentes del medio Integra). Se dispuso medio Integra solo (1 l) en las cámaras grandes de los matraces Integra. La membrana que separa las dos cámaras es permeable a nutrientes de bajo peso molecular, pero es impermeable a células de hibridoma y a anticuerpos producidos por estas células. Por tanto, Las células de hibridoma y los anticuerpos producidos por estas células de hibridoma se retuvieron en la cámara pequeña.

Tras una semana, se retiró el medio de ambas cámaras del matraz Integra y se reemplazó con medio Integra fresco.

Se retuvieron por separado los medios recogidos de las cámaras pequeñas. Después de una segunda semana de crecimiento, se recogió nuevamente el medio de la cámara pequeña. Se combinaron los medios recogidos de la semana 1 de la línea de hibridoma con los medios recogidos de la semana 2 de la línea de hibridoma. La muestra de medio recogida resultante de la línea de hibridoma se centrifugó para retirar células y restos (15 minutos a 3000rpm) y se filtró el sobrenadante resultante (0,22 µm). El medio condicionado clarificado se cargó en una columna de proteína A-Sepharose. Opcionalmente, puede concentrarse primero el medio y después cargarse en una columna de proteína A Sepharose. Las uniones no específicas se retiraron mediante un lavado exhaustivo con PBS. Las proteínas unidas al anticuerpo en la columna de proteína A se recuperaron mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (tal como citrato 50 mM, pH 3,0). Las proteínas de anticuerpo agregadas en el grupo de proteína A Sepharose se retiraron mediante cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico de unión en una resina de intercambio aniónico, tal como resina Q Sepharose. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 31H4 son Q-Sepharose HP a pH 7,8-8,0. El anticuerpo se eluyó con un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en 25 volúmenes de columna.

TABLA 5

Composición de los medios
MEDIO INTEGRA
HSFM
Suero ultrabajo en IgG al 10 %
2 mmol/L de L-glutamina
NEAA al 1 %
4 g/l de glucosa

EJEMPLO 4.2

Producción de anticuerpos IgG2 humanos 31H4 de células transfectadas

El presente ejemplo explica cómo se produjeron anticuerpos IgG2 31H4 a partir de células transfectadas. Se transfectaron células 293 para expresión transitoria y células CHO para expresión estable con plásmidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de 31H4. Se recuperó el medio condicionado de células transfectadas retirando las células y los restos celulares. El medio condicionado clarificado se cargó en una columna de proteína A-Sepharose. Opcionalmente, puede concentrarse primero el medio y después cargarse en una columna de proteína A Sepharose. Las uniones no específicas se retiraron mediante lavado exhaustivo con PBS. Las proteínas unidas al anticuerpo en la columna de proteína A se recuperaron mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (tal como citrato 50 mM, pH 3,0). Las proteínas de anticuerpo agregadas en el grupo de proteína A Sepharose se retiraron mediante cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico de unión en una resina de intercambio aniónico, tal como resina Q Sepharose. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 31H4 son Q-Sepharose HP a pH 7,8-8,0. El anticuerpo se eluyó con un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en 25 volúmenes de columna.

EJEMPLO 5

Producción de anticuerpos IgG4 21B12 humanos a partir de hibridomas

El presente ejemplo explica cómo se produjo el anticuerpo IgG4 21B12 a partir de hibridomas. Se cultivó la línea de hibridoma 21B12 en matraces T75 en medio (Medio Integra, tabla 5). Cuando los hibridomas eran prácticamente confluentes en los matraces T75, se transfirieron a matraces Integra (Integra Biosciences, Integra CL1000, n.º de cat. 90 005).

El matraz Integra es un matraz de cultivo celular que está dividido por medio de una membrana en dos cámaras, una cámara pequeña y una cámara grande. Se dispuso un volumen de 20-30 ml de células de hibridoma a una densidad celular mínima de $1x10^6$ células por ml de la línea de hibridoma 31H4 en la cámara pequeña de un matraz Integra en medio Integra (véase la tabla 5 para los componentes del medio Integra). Se dispuso medio Integra solo (1 l) en las cámaras grandes de los matraces Integra. La membrana que separa las dos cámaras es permeable a nutrientes de bajo peso molecular, pero es impermeable a células de hibridoma y a anticuerpos producidos por estas células. Por tanto, Las células de hibridoma y los anticuerpos producidos por estas células de hibridoma se retuvieron en la cámara pequeña.
Tras una semana, se retiró el medio de ambas cámaras del matraz Integra y se reemplazó con medio Integra fresco. Se retuvieron por separado los medios recogidos de las cámaras pequeñas. Después de una segunda semana de crecimiento, se recogió nuevamente el medio de la cámara pequeña. Se combinaron los medios recogidos de la semana 1 de la línea de hibridoma con los medios recogidos de la semana 2 de la línea de hibridoma. La muestra de

medio recogida resultante de la línea de hibridoma se centrifugó para retirar células y restos (15 minutos a 3000 rpm) y se filtró el sobrenadante resultante (0,22 µm). Los medios condicionados clarificados se cargaron en una columna de proteína A Sepharose. Opcionalmente, los medios se concentran en primer lugar y después se cargan en una columna de proteína A Sepharose. Las uniones no específicas se retiraron mediante un lavado exhaustivo con PBS. Las proteínas unidas al anticuerpo en la columna de proteína A se recuperaron mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (tal como citrato 50 mM, pH 3,0). Las proteínas de anticuerpo agregadas en el grupo de proteína A Sepharose se retiraron mediante cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico de unión en una resina de intercambio aniónico, tal como resina Q Sepharose. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 21B12 son Q-Sepharose HP a pH 7,8-8,0. El anticuerpo se eluyó con un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en 25 volúmenes de columna.

EJEMPLO 6

Producción de anticuerpos IgG2 21B12 humanos a partir de células transfectadas

El presente ejemplo explica cómo se produjeron anticuerpos IgG2 21B12 a partir de células transfectadas. Las células (células 293 para expresión transitoria y células CHO para expresión estable) se transfectaron con plásmidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras de 21B12. Se recuperaron los medios condicionados de las células de hibridoma retirando las células y los restos celulares. Los medios condicionados clarificados se cargaron en una columna de proteína A-Sepharose. Opcionalmente, puede concentrarse primero el medio y después cargarse en una columna de proteína A Sepharose. Las uniones no específicas se retiraron mediante lavado exhaustivo con PBS. Las proteínas unidas al anticuerpo en la columna de proteína A se recuperaron mediante elución de anticuerpo ácida convencional de las columnas de proteína A (citrato 50 mM, pH 3,0). Las proteínas de anticuerpo agregadas en el grupo de proteína A Sepharose se retiraron mediante cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de intercambio iónico de unión en una resina de intercambio catiónico, tal como resina SP-Sepharose. Las condiciones de IEX específicas para las proteínas 21B12 fueron SP-Sepharose HP a pH 5,2. Los anticuerpos se eluyeron con 25 volúmenes de columna de tampón que contiene un gradiente de NaCl de 10 mM-500 mM en tampón de acetato de sodio 20 mM.

EJEMPLO 7

Análisis de secuencia de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo

Posteriormente se determinaron las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos para las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos anteriores mediante secuenciación de (didesoxi) nucleótidos de Sanger. Posteriormente, se dedujeron las secuencias de aminoácidos para las secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico para los dominios variables se representan en las FIG. 3E-3JJ.

Se determinaron las secuencias de ADNc para las regiones variables de cadena ligera lambda de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como las SEQ ID NO: 153, 95 y 105, respectivamente.

Se determinaron las secuencias de ADNc para las regiones variables de cadena pesada de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como las SEQ ID NO: 152, 94 y 104, respectivamente.

La región constante de cadena ligera lambda (SEQ ID NO: 156) y las regiones constantes de cadena pesada de IgG2 e IgG4 (SEQ ID NO: 154 y 155) se muestran en la FIG. 3KK.

Se determinaron las secuencias de polipéptido predichas a partir de cada una de estas secuencias de ADNc. Se predijeron las secuencias de polipéptido predichas para las regiones variables de cadena ligera lambda de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como las SEQ ID NO: 12, 23 y 35, respectivamente, se predijeron la región constante de cadena ligera lambda (SEQ ID NO: 156), las regiones variables de cadena pesada de 31H4, 21B12 y 16F12 y se divulgan como las SEQ ID NO: 67, 49 y 79, respectivamente. Las regiones constantes de cadena pesada de IgG2 e IgG4 (SEQ ID NO: 154 y 155).

Las divisiones de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 se muestran en las FIG 2A-3D.

Basándose en los datos de secuencia, se determinaron los genes de línea germinal de los que procedía cada región variable de cadena pesada o de cadena ligera. La identidad de los genes de línea germinal se indica a continuación de la línea de hibridoma correspondiente en las FIG. 2A-3D y cada una se representa por una SEQ ID NO única. Las FIG. 2A-3D también representan las secuencias de aminoácidos determinadas para los anticuerpos adicionales que se caracterizaron.

EJEMPLO 8

Caracterización de la unión de anticuerpos dirigidos contra PCSK9

Habiéndose determinado una serie de anticuerpos que se unen a PCSK9, se emplearon varias estrategias para cuantificar y caracterizar adicionalmente la naturaleza de la unión. En un aspecto del estudio, se llevó a cabo un análisis de la afinidad Biacore. En otro aspecto del estudio, se llevó a cabo un análisis de la afinidad KinExA®. Las muestras y tampones empleados en estos estudios se presentan en la tabla 6 a continuación.

TABLA 6

muestra	**[muestra] mg/ml**	**Tampón**	**[muestra] μm**
hPCSK9	1,26	PBS	16,6
mPCSK9-8xHIS	1,44	PBS	18,9
cPCSK9-V5-6xHIS	0,22	PBS	2,9
16F12, huIgG4 anti-PCSK9	4,6	NaOAC 20 mM, pH 5,2, NaCl 50 mM	31,9
21B12, huIgG4 anti-PCSK9	3,84	NAOAC 10 mM, pH 5,2, sacarosa al 9 %	27,0
31H4, huIgG4 anti-PCSK9	3,3	NAOAC 10 mM, pH 5,2, sacarosa al 9 %	22,9

Mediciones de afinidad BIAcore®

Se llevó a cabo un análisis de la afinidad BIAcore® (dispositivo de resonancia de plasmón superficial, Biacore, Inc., Piscataway, NJ) de los anticuerpos 21B12 dirigidos contra PCSK9 descritos en este ejemplo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En resumen, los experimentos de resonancia de plasmón superficial se llevaron a cabo usando biosensores ópticos Biacore 2000 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Cada anticuerpo anti-PCSK9 individual se inmovilizó en una placa biosensora CM5 de grado de investigación mediante acoplamiento de amina a niveles que proporcionaron una respuesta de unión de analito máxima (Rmáx) de no más de 200 unidades de resonancia (UR). Se varió la concentración de proteína PCSK9 a intervalos de factor 2 (el analito) y se inyectó sobre la superficie con anticuerpo inmovilizado (a un caudal de 100 µl/min durante 1,5 minutos). Como tampón de unión se usó tampón HBS-P fresco (pH 7,4, Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioactivo P-20 al 0,005 %, Biacore) suplementado con BSA al 0,01 %. Se midieron las afinidades de unión de cada anticuerpo anti-PCSK9 en experimentos separados frente a cada una de las proteínas PCSK9 humanas, de ratón y de mono cinomolgo a pH 7,4 (las concentraciones usadas fueron 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 0 nM).

Además, también se midieron las afinidades de unión del anticuerpo contra PCSK9 humana a pH 6,0 con el tampón de HBS-P a pH 6,0 (pH 6,0, Hepes 0,01 M, NaCl 0,15 M, tensioactivo P-20 al 0,005 %, Biacore) suplementado con BSA al 0,01 %. La señal de unión obtenida fue proporcional a PCSK9 libre en solución. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se obtuvo a partir de análisis de regresión no lineal de las curvas de competición usando un modelo de unión homogéneo de un sitio de curva dual (programa informático KinExA®, Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID) (n=1 para las ejecuciones a pH 6.0). Curiosamente, los anticuerpos parecieron mostrar una afinidad de unión más estrecha al pH más bajo (donde la Kd fue de 12,5, 7,3 y 29 pM para 31H4, 21B12 y 16F12, respectivamente).

Los parámetros cinéticos de unión, incluyendo ka (constante de velocidad de asociación), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (constante de disociación en equilibrio) se determinaron usando el programa informático BIAevaluation 3.1 (BIAcore, Inc. Piscataway, NJ). Las menores constantes de disociación en el equilibrio indican una mayor afinidad del anticuerpo por PCSK9. Los valores de K_D determinados mediante el análisis de afinidad BIAcore® se presentan en la tabla 7.1, mostrada a continuación.

TABLA 7.1

Anticuerpo	hPCSK9	CynoPCSK9	mPCSK9
31H4	210 pM	190 pM	6 nM
21B12	190 pM	360 pM	460 nM
16F12	470 pM	870 pM	6,4 nM

La tabla 7.2 representa las velocidades k_{on} y k_{off}.

TABLA 7.2

-	K_{on} (M-1 s-1)	K_{off} (s-1)	K_D
31H4.1, pH 7,4	2,45 e+5	5,348 e-5	210 pM
31H4.1, pH 6	5,536 e+6	6,936 e-5	12,5 pM
21B12.1, pH 7,4	3,4918 e+4	6,634 e-6	190 pM
21B12.1, pH 6	2,291 e+6	1,676 e-5	7,3 pM
16F12.1, pH 7,4	1,064 e+5	4,983 e-5	470 pM
16F12.1, pH 6	2,392 e+6	7,007 e-5	29 pM

Mediciones de afinidad KinExA®

Se llevó a cabo un análisis de afinidad KinExA® (Sapidyne Instruments, Inc., Boise, ID) de 16F12 y 31H4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, Se precubrió Reacti-Gel™ (6x) (Pierce) con una de las proteínas PCSK9 humana, de cinomolgo marcada con V5 o de ratón marcada con His y se bloqueó con BSA. Después, se incubaron 10 o 100 pM de anticuerpo 31H4 y una de las proteínas PCSK9 con diversas concentraciones (0,1 pM - 25 nM) de proteínas PCSK9 a temperatura ambiente durante 8 horas antes de pasarse a través de las perlas recubiertas con PCSK9. Se cuantificó la cantidad de 31H4 unido a perlas mediante anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) humana marcado fluorescentemente (Cy5) (Jackson Immuno Research). La señal de unión es proporcional a la concentración de 31H4 libre en equilibrio de unión. Las constantes de disociación en el equilibrio (K_D) se obtuvieron mediante regresión no lineal de los dos conjuntos de curvas de competición usando un modelo de unión homogénea de un sitio. Se empleó el programa informático KinExA® Pro en el análisis. Las curvas de unión generadas en este análisis se presentan como las FIG. 4A-4F.

Los anticuerpos tanto 16F12 como 31H4 mostraron una afinidad similar frente a PCSK9 humana y de cinomolgo, pero una afinidad aproximadamente 10-250 veces menor frente a PCSK9 de ratón. De los dos anticuerpos ensayados usando el sistema KinExA®, el anticuerpo 31H4 mostró una mayor afinidad contra PCSK9 tanto humana como de cinomolgo con una K_D de 3 y 2 pM, respectivamente. 16F12 mostró una afinidad ligeramente menor, con una K_D de 15pM frente a PCSK9 humana y una K_D de 16 pM frente a PCSK9 de cinomolgo.

Los resultados del análisis de afinidad KinExA® se resumen en la tabla 8.1, mostrada a continuación.

TABLA 8.1

	hPCSK9		cPCSK		mPCSK	
Muestra	**K_D (pM)**	IC al 95 %	**K_D (pM)**	IC al 95 %	**K_D (pM)**	IC al 95 %
31H4.1	**3**	1~ 5	**2**	1~ 3	**500**	400~620

Además, se llevó a cabo una SDS-PAGE para comprobar la calidad y cantidad de las muestras y se muestra en la FIG. 5A. cPCSK9 mostró aproximadamente un 50 % menos sobre el gel y también respecto de la concentración activa de unión calculada a partir del ensayo KinExA®. Por tanto, se ajustó la K_D de los mAb dirigidos contra cPCSK9 como un 50 % de la cPCSK9 activa presente.

Se usó un ensayo de unión en equilibrio en solución BIAcore para medir los valores de Kd para la ABP 21B12. 21B12.1 mostró poca señal usando el ensayo KinExA, por lo tanto, se aplicó el ensayo de equilibrio en solución BIAcore. Debido a que no se observó una unión significativa en la unión de los anticuerpos a la superficie con PCSK9 inmovilizada, se inmovilizó el anticuerpo 21B12 en la celda de flujo 4 de una placa CM5 usando acoplamiento de amina con una densidad de aproximadamente 7000 UR. La celda de flujo 3 se usó como control de fondo. Se mezclaron 0,3, 1 y 3 nM de PCSK9 humana o PCSK9 de cinomolgo con diluciones seriadas de muestras de anticuerpo 21B12.1 (en el intervalo de 0,001 - 25 nM) en PBS más 0,1 mg/ml de BSA, P20 al 0,005 %. La unión de la PCSK9 libre en las soluciones mixtas se midió mediante inyección sobre la superficie de anticuerpo 21B12.1. La señal de unión de PCSK9 del 100 % sobre la superficie de 21B12.1 se determinó en ausencia de mAb en la solución. Una respuesta de unión de PCSK9 reducida con el aumento de las concentraciones de mAb indicó que PCSK9 se une al mAb en solución, que bloquea la unión de PCSK9 a la superficie de pepticuerpo inmovilizado. Representando la señal de unión de PCSK9 frente a las concentraciones del mAb, se calculó la K_D a partir de tres conjuntos de curvas (concentración fija de PCSK9 de 0,3, 1 y 3 nM) usando un modelo de unión homogénea en el programa informático KinExA Pro™. Aunque cPCSK9 tiene una menor concentración de proteína observada en el ensayo KinExA y gel de SDS, su concentración no se ajustó en este caso debido a que no se usó la concentración de cPCSK9 para el cálculo de la K_D. Los resultados se presentan en la tabla 8.2 a continuación y en las FIG. 5B-5D. La FIG. 5B representa los resultados del ensayo de

equilibrio en solución a las tres diferentes concentraciones de hPCSK9 para hPCSK9. La FIG. 5C representa un conjunto de resultados similar para mPCSK9. La FIG. 5D representa los resultados del ensayo de captura BIAcore anterior.

TABLA 8.2

	hPCSK9		cPCSK		mPCSK	
Muestra	**KD (pM)**	**IC al 95 %**	**KD (pM)**	**IC al 95 %**	**KD (pM)**	**IC al 95 %**
21B12.1	15	9~23	11	7~ 16	17000	-

EJEMPLO 9

Eficacia de 31H4 y 21B12 para bloquear la unión de PCSK9 D374Y/LDLR

Este ejemplo proporciona los valores de CI50 para los dos anticuerpos a la hora de bloquear la capacidad de PCSK9 D374Y para unirse a LDLR. Se recubrieron placas transparentes de 384 pocillos (Costar) con 2 microgramos/ml de anticuerpo de cabra anti-receptor de LDL (R&D Systems) diluido en tampón A (cacodilato de sodio 100 mM, pH 7,4). Las placas se lavaron exhaustivamente con tampón A y después se bloquearon durante 2 horas con tampón B (leche al 1 % en tampón A). Después del lavado, se incubaron las placas durante 1,5 horas con 0,4 microgramos/ml de receptor de LDL (R&D Systems) diluido en tampón C (tampón B suplementado con CaCl2 10 mM). De manera concurrente con esta incubación, se incubaron 20 ng/ml de PCSK9 D374Y biotinilada con diversas concentraciones del anticuerpo IgG2 31H4, IgG4 31H4, IgG2 21B12 o IgG4 21B12, que se diluyó en tampón A o solo tampón A (control). Las placas que contenían receptor de LDL se lavaron y se transfirió a estas la mezcla de PCSK9 D374Y biotinilada/anticuerpo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión de D374Y biotinilada al receptor de LDL se detectó mediante incubación con estreptavidina-HRP (Biosource) a 500 ng/ml en tampón C, seguido de sustrato de TMB (KPL). La señal se inactivó con HCl 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Los resultados de este estudio de unión se muestran en las FIG. 6A-6D. En resumen, se determinaron los valores de CI_{50} para cada anticuerpo y se observó que eran de 199 pM para la IgG2 31H4 (FIG. 6A), 156 pM para la IgG4 31H4 (FIG. 6B), 170 pM para la IgG2 21B12 (FIG. 6C) y 169 pM para la IgG4 21B12 (FIG. 6D).

Los anticuerpos también bloquearon la unión de PCSK9 de tipo silvestre al LDLR en este ensayo.

EJEMPLO 10

Ensayo de captación celular de LDL

Este ejemplo demuestra la capacidad de diversas proteínas de unión a antígeno para reducir la captación de LDL por células. Se sembraron células HepG2 humanas en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (Costar) a una concentración de $5x10^5$ células por pocillo en medio DMEM (Mediatech, Inc.) suplementado con FBS al 10 % y se incubaron a 37 °C (CO2 al 5 %) durante una noche. Para formar el complejo de PCSK9 y anticuerpo, se incubaron 2 µg/ml de PCSK9 D374Y humana con diversas concentraciones de anticuerpo diluido en tampón de captación (DMEM con FBS al 1 %) o solo tampón de captación (control) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las células con PBS, se transfirió la mezcla de PCSK9 D374Y/anticuerpo a las células, seguido de LDL-BODIPY (Invitrogen) diluido en tampón de captación a una concentración final de 6 µg/ml. Después de incubar durante 3 horas a 37 °C (CO2 al 5 %), se lavaron las células exhaustivamente con PBS y se detectó la señal de fluorescencia de las células mediante Safire™ (TECAN) a 480-520nm (excitación) y 520-600nm (emisión).

Los resultados del ensayo de captación celular se muestran en las FIG. 7A-7D. En resumen, se determinaron los valores de CI_{50} para cada anticuerpo y se observó que eran de 16,7 nM para la IgG2 31H4 (FIG. 7A), 13,3 nM para la IgG4 31H4 (FIG. 7B), 13,3 nM para la IgG2 21B12 (FIG. 7C) y 18 nM para la IgG4 21B12 (FIG. 7D). Estos resultados de muestran que las proteínas de unión a antígeno aplicadas pueden reducir el efecto de PCSK9 (D374Y) para bloquear la captación de LDL por las células. Los anticuerpos también bloquearon el efecto de PCSK9 de tipo silvestre en este ensayo.

EJEMPLO 11

Efecto de reducción del colesterol sérico del anticuerpo 31H4 en un estudio de 6 días

Para evaluar la reducción del colesterol sérico total (TC) en ratones de tipo silvestre (TS) mediante terapia con anticuerpos dirigidos contra la proteína PCSK9, se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

Se alimentó a ratones TS macho (estirpe C57BL/6, 9-10 semanas de edad, 17-27 g) obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) con un alimento normal (Harland-Teklad, Dieta 2918) durante la duración del experimento. Se

administró a los ratones o bien el anticuerpo 31H4 anti-PCSK9 (2 mg/ml en PBS) o IgG de control (2 mg/ml en PBS) a un nivel de 10 mg/kg a través de la vena caudal del ratón en T=0. También se apartaron ratones sin tratamiento previo como un grupo de control sin tratamiento. Los grupos de dosificación y el tiempo de sacrificio se muestran en la tabla 9.

TABLA 9

Grupo	Tratamiento	Punto de tiempo después de la dosis	Número
1	IgG	8 h	7
2	31H4	8 h	7
3	IgG	24 h	7
4	31H4	24 h	7
5	IgG	72 h	7
6	31H4	72 h	7
7	IgG	144 h	7
8	31H4	144 h	7
9	Sin tratamiento	n/d	7

Se sacrificó a los ratones con asfixia con CO2 en los puntos de tiempo predeterminados mostrados en la tabla 9. Se recogió sangre a través de la vena cava en tubos Eppendorf y se dejó coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras en una centrifugadora de sobremesa a 12.000xg durante 10 minutos para separar el suero. Se midieron el colesterol sérico total y el HDL-C usando un analizador clínico Hitachi 912 y kits de TC y HDL-C de Roche/Hitachi.

Los resultados del experimento se muestran en las FIG. 8A-8D. En resumen, los ratones a los que se administró el anticuerpo 31H4 mostraron niveles séricos de colesterol reducidos a lo largo del experimento (FIG. 8A y FIG. 8B). Además, obsérvese que los ratones también mostraron niveles reducidos de HDL (FIG. 8C y FIG. 8D). Para la FIG. 8A y la FIG. 8C, el porcentaje de cambio es en relación con la IgG de control en el mismo punto (*P<0,01, # P<0,05). Para la FIG. 8B y la FIG. 8D, el cambio en el porcentaje es en relación con el colesterol sérico total y los niveles de HDL medidos en animales no sometidos a tratamiento en t=0 h (*P<0,01, # P<0,05).

Con respecto a los niveles de HDL reducidos, obsérvese que un experto en la materia apreciará que la reducción en HDL en los ratones no es indicativa de que se producirá una reducción de HDL en seres humanos y únicamente refleja además que se ha reducido el nivel sérico de colesterol en el organismo. Obsérvese que los ratones transportan la mayoría del colesterol sérico en partículas de lipoproteína de alta densidad (HDL), lo que es diferente a los seres humanos, que portan la mayor parte del colesterol en partículas de LDL. En ratones, la medición del colesterol sérico total se asemeja más al nivel sérico de HDL-C. La HDL de ratón contiene apolipoproteína E. (apoE), que es un ligando para el receptor de LDL (LDLR) y permite su eliminación por el LDLR. Por tanto, el examen de HDL es un indicador adecuado para el presente ejemplo, en ratones (entendiéndose que no se espera una reducción de HDL en seres humanos). Por ejemplo, la HDL humana, por el contrario, no contiene apoE y no es un ligando para el LDLR. Ya que los anticuerpos dirigidos contra PCSK9 aumentan la expresión de LDLR en ratones, el hígado puede eliminar más HDL y por lo tanto, reduce los niveles séricos de HDL-C.

EJEMPLO 12

Efecto del anticuerpo 31H4 en los niveles de LDLR en un estudio de 6 días

El presente ejemplo demuestra que una proteína de unión a antígeno altera el nivel de LDLR en un sujeto, como se ha predicho, a lo largo del tiempo. Se llevó a cabo un análisis de transferencia de Western para determinar el efecto del anticuerpo 31H4 en los niveles de LDLR. Se homogeneizaron 50-100 mg de tejido hepático obtenido de los ratones sacrificados descritos en el ejemplo 13 en 0,3 ml de tampón RIPA (Santa Cruz Biotechnology Inc.) que contenía inhibidor de proteasa completo (Roche). El homogeneizado se incubó sobre hielo durante 30 minutos y se centrifugó para sedimentar los restos celulares. La concentración de proteína en el sobrenadante se midió usando reactivos de ensayo de proteínas de BioRad (BioRad Laboratories). Se desnaturalizaron 100 µg de la proteína a 70 °C durante 10 minutos y se separaron en gel de gradiente de SDS de Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen). Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF de 0,45 µm (Invitrogen) y se bloqueó en tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 2 mM y Tween 20 al 0,05 %) que contenía leche desgrasada al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se sondó la transferencia con anticuerpo de cabra anti-LDLR de ratón (R&D Systems) a 1:2000 o anti-B actina (Sigma) a 1:2000 durante 1 hora a temperatura ambiente. La transferencia se lavó brevemente y se incubó con anticuerpo bovino anti-IgG de cabra-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 1:2000 o anticuerpo de

cabra anti-IgG de ratón-HRP (Upstate) a 1:2000. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se lavó exhaustivamente la transferencia y se detectaron las bandas inmunorreactivas usando el kit ECL Plus (Amersham Biosciences). La transferencia de Western mostró un aumento en los niveles de proteína LDLR en presencia del anticuerpo 31H4, como se representa en la FIG. 9.

EJEMPLO 13

Efecto reductor del colesterol sérico del anticuerpo 31H4 en un estudio de 13 días

Para evaluar la reducción del colesterol sérico total (TC) en ratones de tipo silvestre (TS) mediante terapia con anticuerpos dirigidos contra la proteína PCSK9 en un estudio de 13 días, se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

Se alimentó a ratones TS macho (estirpe C57BL/6, 9-10 semanas de edad, 17-27 g) obtenidos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) con un alimento normal (Harland-Teklad, Dieta 2918) durante la duración del experimento. Se administró a los ratones o bien el anticuerpo 31H4 anti-PCSK9 (2 mg/ml en PBS) o IgG de control (2 mg/ml en PBS) a un nivel de 10 mg/kg a través de la vena caudal del ratón en T=0. También se apartaron ratones sin tratamiento previo como grupo de control sin tratamiento.

Los grupos de dosificación y el tiempo de sacrificio se muestran en la tabla 10. Se sacrificó a los animales y se extrajeron y prepararon los hígados como en el ejemplo 13.

TABLA 10

Grupo	Tratamiento	Punto de tiempo después de la dosis	Número	Dosis
1	IgG	72 h	6	10 mg/kg
2	31H4	72 h	6	10 mg/kg
3	31H4	72 h	6	1 mg/kg
4	IgG	144 h	6	10 mg/kg
5	31H4	144 h	6	10 mg/kg
6	31H4	144 h	6	1 mg/kg
7	IgG	192 h	6	10 mg/kg
8	31H4	192 h	6	10 mg/kg
9	31H4	192 h	6	1 mg/kg
10	IgG	240 h	6	10 mg/kg
11	31H4	240hr	6	10 mg/kg
12	31H4	240hr	6	1 mg/kg
13	IgG	312 h	6	10 mg/kg
14	31H4	312 h	6	10 mg/kg
15	31H4	312 h	6	1 mg/kg
16	Sin tratamiento	n/d	6	n/d

Cuando se extendió el experimento de 6 días hasta un estudio de 13 días, el mismo efecto de reducción del colesterol sérico observado en el estudio de 6 días también se observó en el estudio de 13 días. Más específicamente, los animales que recibieron dosis de 10 mg/kg demostraron una reducción del 31 % en el colesterol sérico en el día 3, que gradualmente retornaron a los niveles antes de la dosis en el día 13. La FIG. 10A representa los resultados de este experimento. La FIG. 10C representa los resultados de la repetición del procedimiento anterior con la dosis de 10 mg/kg de 31H4 y con otro anticuerpo, 16F12, también a 10 mg/kg. Los grupos de dosificación y el tiempo de sacrificio se muestran en la tabla 11.

TABLA 11

Grupo	Tratamiento	Punto de tiempo después de la dosis	Número	Dosis
1	IgG	24 h	6	10 mg/kg
2	16F12	24 h	6	10 mg/kg
3	31H4	24 h	6	10 mg/kg
4	IgG	72 h	6	10 mg/kg
5	16F12	72 h	6	10 mg/kg
6	31H4	72 h	6	10 mg/kg
7	IgG	144 h	6	10 mg/kg
8	16F12	144 h	6	10 mg/kg
9	31H4	144 h	6	10 mg/kg
10	IgG	192 h	6	10 mg/kg
11	16F12	192 h	6	10 mg/kg
12	31H4	192 h	6	10 mg/kg
13	IgG2	240 h	6	10 mg/kg
14	16F12	240hr	6	10 mg/kg
15	31H4	240hr	6	10 mg/kg
16	IgG2	312 h	6	10 mg/kg
17	16F12	312 h	6	10 mg/kg
18	31H4	312 h	6	10 mg/kg
19	Sin tratamiento	n/d	6	10 mg/kg

Como se muestra en la FIG. 10C, tanto 16F12 como 31H4 dieron como resultado reducciones significativas y sustanciales en el colesterol sérico total después de tan solo una dosis y proporcionaron beneficios durante más de una semana (10 días o más). Los resultados del estudio de 13 días repetido fueron coherentes con los resultados del primer estudio de 13 días, observándose una reducción en los niveles séricos de colesterol del 26 % en el día 3. Para la FIG. 10A y la FIG. 10B, el porcentaje de cambio es en relación con la IgG de control en el mismo punto (*P<0,01). Para la FIG. 10C, el porcentaje de cambio es en relación con la IgG de control en el mismo punto (*P<0,05).

EJEMPLO 14

Efecto del anticuerpo 31H4 en los niveles de HDL en un estudio de 13 días

También se examinaron los niveles de HDL para los animales en el ejemplo 15. Los niveles de HDL se redujeron en los ratones. Más específicamente, los animales que recibieron dosis de 10 mg/kg demostraron una reducción del 33 % en los niveles de HDL en el día 3, que gradualmente retornaron a los niveles antes de la dosis en el día 13. La FIG. 10B representa los resultados del experimento. Se produjo una reducción en los niveles de HDL del 34 % en el día 3. La FIG. 10B representa los resultados del experimento de 13 días repetido.

Como apreciará un experto en la materia, aunque los anticuerpos reducirán la HDL de los ratones, no se espera que esto suceda en seres humanos debido a las diferencias en la HDL en seres humanos y otros organismos (tales como ratones). Por tanto, la reducción en la HDL de ratón no es indicativa de una reducción en la HDL humana.

EJEMPLO 15

La administración repetida de anticuerpos produce beneficios continuados de los péptidos de unión a antígeno

Para verificar que los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores pueden prolongarse para beneficios adicionales con dosis adicionales, se repitieron los experimentos en los ejemplos 15 y 16 con la pauta posológica representada en la FIG. 11A. Los resultados se presentan en la FIG. 11B. Como puede observarse en la gráfica en la FIG. 11B, aunque los dos grupos de ratones mostraron una reducción significativa en el colesterol sérico total debido a que todos los ratones recibieron una inyección inicial de la proteína de unión a antígeno 31H4, los ratones que recibieron

inyecciones adicionales de la ABP 31H4 mostraron una reducción continuada en el colesterol sérico total, mientras que aquellos ratones que recibieron únicamente la inyección de control acabaron mostrando un aumento en su colesterol sérico total. Para la FIG. 11, el porcentaje de cambio es en relación con los animales no expuestos a tratamiento en t=0 horas (*P<0,01, **P<0,001).

Los resultados de este ejemplo demuestran que, a diferencia de otros métodos de tratamiento para el colesterol, en los que las aplicaciones repetidas dan lugar a una reducción en la eficacia debido a ajustes biológicos en el sujeto, la presente estrategia no parece adolecer de este problema durante el periodo de tiempo examinado. Además, esto sugiere que el retorno a los niveles basales de colesterol sérico total o de colesterol asociado a HDL, observados en los ejemplos anteriores, no se debe que el sujeto esté desarrollando resistencia al tratamiento, sino al agotamiento de la disponibilidad del anticuerpo en el sujeto.

EJEMPLO 16

Usos de anticuerpos dirigidos contra PCSK9 para el tratamiento de trastornos relacionados con el colesterol

Se administra a un paciente humano que presenta un trastorno relacionado con el colesterol (en el que puede ser beneficiosa una reducción en el colesterol (tal como el colesterol sérico) una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo dirigido contra PCSK9, 31H4 (o, por ejemplo, 21B12). A intervalos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente para determinar si han remitido los síntomas del trastorno. Después del tratamiento, se observa que los pacientes sometidos a tratamiento con el anticuerpo dirigido contra PCSK9 tienen niveles séricos de colesterol reducidos, en comparación con pacientes que no reciben tratamiento.

EJEMPLO 17

Usos de anticuerpos dirigidos contra PCSK9 para el tratamiento de la hipercolesterolemia

Se administra a un paciente humano que muestra síntomas de hipercolesterolemia una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo dirigido contra PCSK9, tal como 31H4 (o, por ejemplo, 21B12). A intervalos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente para determinar si se ha reducido el nivel sérico de colesterol. Después del tratamiento, se observa que el paciente que recibe el tratamiento con los anticuerpos dirigidos contra PCSK9 tiene niveles séricos de colesterol reducidos en comparación con pacientes con artritis que no reciben el tratamiento.

EJEMPLO 18

Usos de anticuerpos dirigidos contra PCSK9 para la prevención de la cardiopatía coronaria y/o eventos cardiovasculares recurrentes

Se identifica a un paciente en riesgo de desarrollar cardiopatía coronaria. Se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo dirigido contra PCSK9, tal como 31H4 (o, por ejemplo, 21B12), ya sea solo, de manera concurrente o secuencial con una estatina, por ejemplo, simvastatina. A intervalos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente para determinar si cambia el nivel sérico de colesterol total del paciente. Durante el tratamiento preventivo, se observa que el paciente que recibe el tratamiento con los anticuerpos dirigidos contra PCSK9 tiene una reducción del nivel sérico de colesterol, reduciendo de este modo su riesgo de cardiopatías coronarias o de eventos cardiovasculares recurrentes, en comparación con pacientes que no reciben el tratamiento.

EJEMPLO 19

Uso de la proteína de unión a antígeno dirigida contra PCSK9 para la prevención de la hipercolesterolemia

Se identifica un paciente humano que muestra un riesgo de desarrollar hipercolesterolemia mediante un análisis de su historial familiar y/o estilo de vida y/o niveles actuales de colesterol. Se administra regularmente al sujeto (por ejemplo, una vez a la semana) una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo dirigido contra PCSK9, 31H4 (o, por ejemplo, 21B12). A intervalos periódicos durante el tratamiento, se monitoriza al paciente para determinar si se han reducido los niveles séricos de colesterol. Después del tratamiento, se observa que los sujetos que se someten al tratamiento preventivo con el anticuerpo dirigido contra PCSK9 tienen niveles séricos de colesterol reducidos, en comparación con sujetos que no reciben tratamiento.

EJEMPLO 20

Un estudio de fase 1, aleatorizado, con doble enmascaramiento, controlado por placebo de dosis única ascendente para evaluar la seguridad, tolerabilidad, la farmacocinética y la farmacodinámica de un anticuerpo humano anti-PCSK9 en sujetos sanos

Este estudio fue un estudio aleatorizado, con doble enmascaramiento, controlado por placebo de dosis única ascendente para evaluar la seguridad, tolerabilidad, PK, farmacodinámica (PD) (LDL-C) e inmunogenicidad de un

anticuerpo humano anti-PCSK9 (anticuerpo monoclonal 21B12) en sujetos sanos. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a una relación 3:1 (21B12:placebo; 8 sujetos por cohorte de dosis hasta un total de 56 sujetos en 7 cohortes) para recibir 21B12 a dosis de 7, 21, 70, 210 o 420 mg SC o el placebo correspondiente; o 21B12 a dosis de 21 o 420 mg IV o el placebo correspondiente.

Se asignaron aleatoriamente cincuenta y seis sujetos y recibieron el producto de ensayo (42 21B12, 14 placebo); 40 sujetos (30 21B12, 10 placebo) recibieron el producto de ensayo por la vía de administración SC y 16 sujetos (12 21B12, 4 placebo) recibieron el producto de ensayo por la vía IV. Cincuenta y tres de los 56 sujetos (95 %) que recibieron el producto de ensayo completaron el estudio. Tres sujetos que recibieron 21B12 retiraron el consentimiento completo y no completaron el estudio.

La población de estudio estaba compuesta principalmente por hombres (54 [96 %]) y tenían una edad media de 31,2 (intervalo: 20 a 45) años. Un ochenta y seis por ciento de los sujetos eran blancos, seguido de un 9 % de hispanos/latinos, un 4 % de negros y un 1 % de otros. Los valores de LDL-C basales medios fueron similares entre los grupos de tratamiento y oscilaron de 113 a 143 mg/dl.

En este estudio, 21B12 redujo el LDL-C en una media del 55 % al 60 % a dosis únicas ≥ 70 mg SC, siendo la duración del efecto dependiente de la dosis. El punto más bajo de LDL-C se observó a las 2 semanas de la dosis. Se observó la supresión completa de PCSK9 con dosis únicas ≥ 70 mg SC, lo que se correlacionó bien con los efectos observados en el LDL-C circulante.

Los análisis PK demostraron que 21B12 mostró una eliminación no lineal (dependiente de la concentración). El $t_{máx}$ medio varió de 4 a 6 días. Como cabía esperar, la mediana de concentración máxima más elevada observada ($C_{máx}$) y el área bajo la curva de concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito ($ABC_{0\text{-}inf}$) se produjeron en el grupo de 420 mg IV y fueron de 139 µg/ml y 1550 día•µg/ml, respectivamente.

Se informó de eventos adversos emergentes por el tratamiento para 29 de los 42 sujetos (69 %) que recibieron 21B12 a cualquier dosis y para 10 de los 14 sujetos (71 %) que recibieron placebo. No se evidenció una relación entre la incidencia de eventos adversos en el sujeto y la dosis de 21B12 o entre la incidencia de eventos adversos en el sujeto y la vía de administración de 21B12 (SC frente a IV).

Ningún evento adverso se registró como serio y ningún sujeto abandonó el estudio a causa de un evento adverso. No hubo muertes durante el estudio.

Se informó de eventos adversos relacionados con el tratamiento para 18 de los 42 sujetos (43 %) que recibieron 21B12 y para 10 de los 14 sujetos (71 %) que recibieron placebo. No se evidenció una relación entre la incidencia de eventos adversos relacionados con el tratamiento en el sujeto y la dosis de 21B12 o entre la incidencia de eventos adversos relacionados con el tratamiento en el sujeto y la vía de administración de 21B12 (SC frente a IV).

No hubo tendencias que indicasen efectos clínicamente importantes de 21B12 en variables de laboratorio seleccionadas, los electrocardiogramas (ECG) o los signos vitales.

En este estudio, 21B12 parecía ser bien tolerado a dosis únicas SC e IV de hasta 420 mg.

Se evaluaron muestras de suero de los sujetos reclutados en este estudio respecto de la presencia (basal) o desarrollo (después del tratamiento) de anticuerpos anti-21B12. Las muestras de los 42 sujetos que recibieron 21B12 fueron negativas para anticuerpos anti-21B12.

EJEMPLO 21

Un estudio de fase 1, aleatorizado, con doble enmascaramiento, controlado por placebo de dosis múltiples ascendentes para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de un anticuerpo humano anti-PCSK9 en sujetos con hiperlipidemia que reciben dosis estables de una estatina

Este estudio es un estudio de fase 1b, aleatorizado, con doble enmascaramiento, controlado por placebo de dosis múltiples ascendentes que usa un anticuerpo humano anti-PCSK9 (anticuerpo monoclonal 21B12) en sujetos hiperlipidémicos (por ejemplo, hipercolesterolémicos) con tratamiento actual con dosis estables de una estatina. El estudio tuvo siete cohortes. Los objetivos para todas las cohortes incluyeron la caracterización de la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad de 21B12 y la caracterización de la PK y PD (LDL-C y PCSK9). Las cohortes 1 a 5 del estudio representaron la porción de aumento de la dosis de 21B12, en sujetos hipercolesterolémicos que recibían dosis estables de bajas a moderadas de una estatina. Los sujetos en las cohortes 1 a 5 (n = 8 por cohorte) con LDL-C (70-200 mg/dl) que toman a diario de manera estable rosuvastatina <40 mg, atorvastatina <80 mg o simvastatina 20-80 mg durante ≥1 mes fueron asignados aleatoriamente a una relación de 3:1 para recibir 1 de 5 dosis SC de 21B12 (14 o 35 mg QW 6 veces; o 140 mg o 280 mg Q2W 3 veces; o 420 mg Q4W 2 veces) o el placebo correspondiente, respectivamente. La cohorte 6 se llevó a cabo en sujetos hipercolesterolémicos que recibían altas dosis de una estatina (80 mg de atorvastatina o 40 mg de rosuvastatina). Los sujetos en esta cohorte (n=12) tomaban

o bien 40 mg de rosuvastatina u 80 mg de atorvastatina y fueron asignados aleatoriamente a una relación de 3:1 para recibir 21B12 (140 mg SC Q2W 3 veces) o el placebo correspondiente, respectivamente. La cohorte 7 se llevó a cabo en sujetos con hipercolesterolemia heterocigota familiar (identificados usando los criterios de la OMS); los sujetos en esta cohorte (n = 6) se asignaron aleatoriamente a una relación de 2:1 para recibir 21B12 (140 mg SC Q2W 3 veces) o el placebo correspondiente, respectivamente.

Se obtuvieron resultados preliminares de 40 sujetos que habían sido reclutados y asignados aleatoriamente a 21B12 o placebo. De estos 40 sujetos, 28 habían recibido ≥ 1 dosis del producto de ensayo (21B12 o placebo) y por tanto, representaron el conjunto de análisis de seguridad preliminar (con enmascaramiento del tratamiento). Los datos de seguridad con enmascaramiento preliminares se encontraban disponibles para estos 28 sujetos, todos los cuales procedían de las cohortes 1 a 4. No se informó de muertes, eventos adversos graves o abandonos tempranos a causa de eventos adversos. En general, se informó de al menos 1 evento adverso para 15 de los 28 sujetos (54 %) que habían recibido ≥ 1 dosis de producto de ensayo. La mayoría de eventos adversos (con enmascaramiento del tratamiento) se comunicaron para sujetos individuales, con la excepción de fatiga, artralgia, estreñimiento e infección vírica de las vías respiratorias superiores, comunicándose cada uno de estos para 2 de los 28 sujetos (7 %).

Los resultados farmacodinámicos preliminares (con enmascaramiento del tratamiento) se encontraban disponibles para las cohortes 1, 2 y 3. Se observó una reducción dependiente de la dosis de 21B12 del LDL-C circulante, en sujetos que recibían dosis estables moderadas de estatinas. El punto más bajo de LDL-C se observó a las 2 semanas de la dosis inicial y se encontró en el intervalo de una reducción del 60 % al 80 % en la cohorte 3 (140 mg Q2W SC 3 veces). Se observó una supresión prácticamente completa de PCSK9 en la cohorte 3, lo que se correlacionó bien con los efectos observados en el LDL-C circulante.

En los resultados finales, los sujetos (N=51) en las cohortes 1-6 fueron asignados aleatoriamente para recibir 21B12 (N=39) o placebo (N=12); 26 sujetos (51 %) eran varones; la edad media (DT) fue de 58 (7) años. No se informó de muertes o eventos adversos (AE) graves y ningún sujeto abandonó el tratamiento a causa de un AE. No se detectaron anticuerpos neutralizantes dirigidos contra 21B12.

Los sujetos en las cohortes 1-5 en tratamiento con dosis de bajas a moderadas de estatinas tuvieron reducciones medias de LDL-C de hasta el 81 % frente a placebo en el punto de máxima reducción y del 75 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 6) después de 3 dosis bisemanales SC de 21B12 y del 66 % al final del intervalo de dosificación (es decir, en la semana 8) después de 2 dosis cada 4 semanas SC. Los sujetos en las cohortes 1-5 en tratamiento con dosis de bajas a moderadas de estatinas tuvieron reducciones máximas de LDL-C de hasta un 81 % frente a placebo en el punto de máxima reducción y del 75 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (figura 14). La magnitud y la duración del efecto fueron dependientes de la dosis. La PCSK9 plasmática fue indetectable a dosis más elevadas. De forma similar, al final del intervalo de dosificación después de 3 dosis bisemanales, los sujetos en tratamiento con altas dosis de estatinas (cohorte 6) tuvieron una reducción media del LDL-C del 63 % frente a placebo y una reducción máxima en el LDL-C del 73 % frente a placebo (figura 15).

Estos datos demuestran que las dosis SC repetidas de 21B12 a lo largo de 6 semanas redujeron el LDL-C circulante hasta un 81 % frente a placebo, dependiendo de la pauta posológica, en sujetos en tratamiento con dosis de bajas a moderadas o altas de estatinas, sin AE graves. El efecto de reducción del LDL-C de 21B12 fue comparable entre los grupos en tratamiento con altas dosis de estatinas y en tratamiento con dosis de bajas a moderadas de estatinas.

Los sujetos en las cohortes 1-5 en tratamiento con dosis de bajas a moderadas de estatinas tuvieron una reducción media de los niveles de PCSK9 de hasta el 94 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación, datos no mostrados. Los sujetos en las cohortes 1-5 en tratamiento con dosis de bajas a moderadas de estatinas tuvieron reducciones medias de ApoB de hasta el 54 % frente al placebo al final del intervalo de dosificación y reducciones máximas de hasta el 59 % frente al placebo (figura 16). Además, los sujetos en las cohortes 1-6 en tratamiento con dosis de bajas a moderadas y elevadas de estatinas tuvieron reducciones medias de Lp(a) de hasta el 43 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (figura 17).

Los sujetos en la cohorte 7 con heFH tuvieron una reducción media en el LDL-C del 65 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC bisemanal de 21B12) y una reducción máxima del LDL-C del 70 % frente a placebo (figura 18). Las reducciones del LDL-C durante el intervalo de dosificación fueron comparables a las observadas en sujetos sin heFH. Después del tratamiento con 21B12, la PCSK9 circulante era indetectable en sujetos con heFH.

Los sujetos en la cohorte 7 con heFH tuvieron una reducción media en los valores séricos de PCSK9 del 78 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis bisemanal SC de 21B12) (figura 19). Los sujetos en la cohorte 7 con heFH tuvieron una reducción media en el colesterol total de hasta el 42 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC bisemanal de 21B12) y una reducción máxima del colesterol total del 47 % frente a placebo (figura 20). Los sujetos en la cohorte 7 con heFH tuvieron una reducción media en el colesterol no-HDL del 61 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC bisemanal de 21B12) y una reducción máxima del colesterol no asociado a HDL del 67 % frente a placebo (figura 21). Los sujetos

en la cohorte 7 con heFH tuvieron una reducción media en los niveles de ApoB de hasta el 47 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis SC bisemanal de 21B12) y una reducción máxima de ApoB del 57 % frente a placebo (figura 22). Los sujetos en la cohorte 7 con heFH tuvieron una reducción media la lipoproteína a (Lp(a)) del 50 % frente a placebo al final del intervalo de dosificación (es decir, semana 6, 2 semanas después de la tercera dosis bisemanal SC de 21B12) (figura 23).

En la cohorte 7, 21B12 redujo los niveles de PCSK9 no unida y redujeron sustancialmente los niveles de LDL-C circulante en sujetos con heFH e hiperlipidemia que estaban recibiendo una terapia convencional. La dosis bisemanal evaluada proporcionó reducciones de LDL-C en sujetos con heFH que fueron comparables con aquellas en los sujetos sin heFH. No se informó de AE graves.

EJEMPLO 22

Un estudio con doble enmascaramiento, aleatorizado, controlado por placebo para evaluar la tolerabilidad y la eficacia de un anticuerpo anti-PCSK9 en pacientes con hipercolesterolemia heterocigótica familiar

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de 12 semanas de administración subcutánea (SC) de anticuerpo humano anti-PCSK9 (anticuerpo monoclonal 21B12) en comparación con placebo, en el porcentaje de cambio respecto del valor inicial en el colesterol asociado con lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en sujetos con hipercolesterolemia heterocigótica familiar (HeFH).

Este estudio es un ensayo clínico con doble enmascaramiento, aleatorizado, estratificado controlado por placebo que evalúa la seguridad, tolerabilidad y eficacia del anticuerpo monoclonal 21B12 en sujetos que tienen un diagnóstico de HeFH. Se planea reclutar un total de 150 sujetos. Se asignarán aleatoriamente a sujetos que cumplen con todos los criterios de inclusión/exclusión con una asignación igual a 3 grupos de tratamiento: anticuerpo monoclonal 21B12 a 350 mg o 420 mg Q4W SC (una vez cada 4 semanas, por vía subcutánea) o placebo Q4W SC. La asignación aleatoria se estratificará detectando de manera sistemática según el nivel de LDL-C (< 130 mg/dl [3,4 mmol/L] frente a ≥ 130 mg/dl) y uso de ezetimibe en la evaluación inicial (sí frente a no). La asignación aleatoria debe producirse antes de 5 -10 días de la evaluación de detección sistemática de LDL-C usada para determinar la elegibilidad. Habrá enmascaramiento respecto del anticuerpo monoclonal, 21B12 y el placebo. Las visitas del estudio son en las semanas 2, 4, 8 y 12. La administración final del anticuerpo monoclonal, 21B12 o el placebo es en la semana 8. La visita al final del estudio (EOS) y la última evaluación de los lípidos es en la semana 12.

Son elegibles para este estudio hombres y mujeres de ≥ 18 a ≤ 75 años y con un diagnóstico de hipercolesterolemia heterocigótica familiar según los criterios diagnósticos del Simon Broome Register Group (SBRG). Para el reclutamiento, los sujetos han de estar en tratamiento con una estatina aprobada, con dosis estables para todos los fármacos reguladores de lípidos permitidos (por ejemplo, ezetimibe, resina secuestrante de ácidos biliares, estanoles o niacina aprobada por las autoridades regulatorias y comercializada (por ejemplo, Niaspan o Niacor)) durante al menos 4 semanas antes de la detección sistemática de LDL-C y que, en opinión del investigador, no requieren aumento de la valoración. El LDL-C en ayunas ha de ser ≥ 100 mg/dl (2,6 mmol/L) y los triglicéridos en ayunas ≤ 400 mg/dl (4,5 mmol/L) según un laboratorio central en la exploración inicial.

Los datos preliminares (datos no mostrados) demostraron que los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de mínimos cuadrados (LS) respecto del valor inicial en el LDL-C del 38,46 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 45,68 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 21,69 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 28,23 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 15,39 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 6,77 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 17,16 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 18,49 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 17,24 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 4,56 %. Los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol no asociado a HDL del 36,16 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol no asociado a HDL del 41,81 %. Finalmente, los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 24,82 % al final del intervalo de dosificación y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 29,45 %. (datos no mostrados)

La figura 24 es una gráfica que representa los datos de reducción del LDL-C para las dosis siguientes de 21B12:

70 mg, 105 mg y 140 mg (dosificación Q2W o una vez cada dos semanas) y 280 mg, 350 mg y 420 (dosificación Q4W o una vez al mes). Estos datos son los datos agregados de los estudios descritos en los ejemplos 22-25. En resumen, los datos agregados muestran que 140 mg Q2W da como resultado una reducción aproximada del 60 % respecto del valor inicial en el LDL-C en la semana 12 y un mantenimiento uniforme de la reducción del LDL-C. Además, estos datos demuestran que 420 mg Q4W da como resultado una reducción aproximada del 56 % respecto del valor inicial en el LDL-C en la semana 12 y un menor rebote de LDL-C al final del intervalo de dosificación.

Las figuras 25A-25D son diagramas de barras que muestran los efectos beneficiosos de las dosis de 21B12 en Lp(a), HDL-C, triglicéridos y VLDL-C, respectivamente, procedentes de los datos agregados de los estudios descritos en los ejemplos 22-25. Además, se observaron reducciones dependientes de la dosis respecto del valor inicial para el colesterol total (25-37 %, valores de p <0,001), no-HDL-C (36-53 %, valores de p <0,001) y ApoB (36-53 %, valores de p < 0,001) (datos no mostrados).

EJEMPLO 23

Un estudio aleatorizado para evaluar la tolerabilidad y la eficacia de un anticuerpo humano anti-PCSK9 en el LDL-C en comparación con ezetimibe en pacientes hipercolesterolémicos incapaces de tolerar una dosis eficaz de un inhibidor de HMG-Co-A reductasa

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de 12 semanas de administración subcutánea (SC) de anticuerpo humano anti-PCSK9 (anticuerpo monoclonal 21B12) en comparación con ezetimibe, en el porcentaje de cambio respecto del valor inicial en el colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en sujetos hipercolesterolémicos incapaces de tolerar una dosis eficaz de un inhibidor de HMG-CoA reductasa.

Este estudio es un ensayo clínico aleatorizado, estratificado de grupos paralelos para el anticuerpo humano anti-PCSK9, el anticuerpo monoclonal 21B12. Se planea reclutar a 150 sujetos. Se asignarán aleatoriamente a sujetos que cumplen con todos los criterios de inclusión/exclusión con una asignación igual a 5 grupos de tratamiento: anticuerpo monoclonal, 21B12 a 280 mg, 350 mg o 420 mg Q4W SC (una vez cada 4 semanas, por vía subcutánea); ezetimibe a 10 mg diarios (QD) por vía oral (PO) con anticuerpo monoclonal, 21B12 a 420 mg Q4W SC; o ezetimibe 10 mg QD PO con placebo Q4W SC. La asignación aleatoria se estratificará detectando de manera sistemática según el nivel de LDL-C (< 130 mg/dl [3,4 mmol/L] frente a ≥ 130 mg/dl) y uso de estatinas en la evaluación inicial (sí frente a no). La asignación aleatoria debe producirse antes de 5 -10 días de la evaluación de detección sistemática de LDL-C usada para determinar la elegibilidad. Habrá enmascaramiento respecto del anticuerpo monoclonal, 21B12 y el placebo. No habrá enmascaramiento con respecto a ezetimibe. Las visitas del estudio son en las semanas 2, 4, 8 y 12. La administración final del anticuerpo monoclonal, 21B12 o el placebo es en la semana 8. La visita al final del estudio y la última evaluación de los lípidos es en la semana 12.

Son elegibles para este estudio hombres y mujeres con edades de ≥ 18 a ≤ 75 años. El sujeto ha de haber probado al menos 1 estatina y no haber sido capaz de tolerar ninguna dosis o un aumento de la dosis de estatina por encima de las siguientes dosis semanales máximas debido a mialgia o miopatía: atorvastatina ≤ 70 mg, simvastatina ≤ 140 mg, pravastatina ≤ 140 mg, rosuvastatina ≤ 35 mg, lovastatina ≤ 140 mg, fluvastatina ≤ 280 mg. Para las estatinas no listadas, la dosis semanal total máxima no debe superar 7 veces el tamaño de comprimido más pequeño disponible. Los síntomas han de haberse resuelto cuando se dejó de tomar la estatina o se redujo la dosis. En caso de estar tomando estatinas (sin superar la dosis máxima definida anteriormente), la resina secuestrante de ácidos biliares y/o la terapia con estanoles, las dosis han de ser estables durante al menos 4 semanas antes de la detección sistemática de LDL-C. En caso de que el sujeto esté en tratamiento con ezetimibe al comienzo de la detección sistemática, ha de dejar de tomar ezetimibe durante ≥ 4 semanas antes de la detección sistemática de LDL-C. Dependiendo de su categoría de riesgo (basándose en los objetivos de tratamiento de NCEP ATP III) los sujetos han de cumplir los siguientes criterios de LDL-C en ayunas (según el laboratorio central) en la detección sistemática: ≥ 100 mg/dl (2,6 mmol/L) para sujetos con cardiopatía coronaria (CHD) o equivalente de riesgo de CHD; ≥ 130 mg/dl (3,4 mmol/L) para sujetos sin CHD diagnosticada o riesgo equivalente y 2 o más factores de riesgo; ≥ 160 mg/dl (4,1 mmol/L) para sujetos sin CHD diagnosticada o riesgo equivalente y 1 o ningún factor de riesgo. Los triglicéridos en ayunas han de ser ≤ 400 mg/dl (4,5 mmol/L) determinados por el análisis del laboratorio central en la detección sistemática.

Los datos preliminares (datos no mostrados) demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 38,79 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 40,01 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 50,63 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 27,38 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 16,04 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 23,84 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 8,62 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio

de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 4,62 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 7,55 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 31,02 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 38,14 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 37,27 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 15,35 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 19,22 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 19,55 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 31,03 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 34,46 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 42,23 %. Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 39,92 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 42,86 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 53,49 %.

EJEMPLO 24

Un estudio aleatorizado controlado por placebo y ezetimibe de búsqueda de dosis para evaluar la tolerabilidad y eficacia de un anticuerpo humano anti-PCSK9 sobre el LDL-C en pacientes hipercolesterolémicos con una puntuación de riesgo de Framingham a 10 años del 10% o menos El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto a las 12 semanas del anticuerpo humano anti-PCSK9 (anticuerpo monoclonal 21B12) por vía subcutánea (SC) cada 2 semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) en comparación con placebo, en el porcentaje de cambio respecto del valor inicial en el colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad (LDL-C) cuando se usa como monoterapia en sujetos hipercolesterolémicos con una puntuación de riesgo de Framingham a 10 años del 10 % o menos.

Este estudio fue un ensayo clínico aleatorizado, estratificado, controlado por placebo y ezetimibe de búsqueda de dosis de grupos paralelos para el anticuerpo humano anti-PCSK9, anticuerpo monoclonal, 21B12, que reclutó a 411 sujetos. Se asignó aleatoriamente a sujetos que cumplen con todos los criterios de inclusión/exclusión con una asignación igual a 9 grupos de tratamiento: 1 de 6 pautas posológicas de anticuerpo monoclonal, 21B12 (70 mg, 105 mg o 140 mg Q2W SC o 280 mg, 350 mg o 420 mg Q4W SC (una vez cada 4 semanas, por vía subcutánea), placebo con administración o Q2W o Q4W SC o ezetimibe con administración diaria (QD) oral (PO). La asignación aleatoria se estratificó según el nivel de LDL-C en la exploración inicial (<130 mg/dl [3,4 mmol/L] frente a > 130 mg/dl). La asignación aleatoria se produjo antes de 5 -10 días de la evaluación de detección sistemática de LDL-C usada para determinar la elegibilidad. Las visitas del estudio fueron cada 2 semanas, independientemente de que el sujeto recibiese el tratamiento Q2W SC o Q4W o ezetimibe. Los 3 grupos de dosis Q2W de anticuerpo monoclonal, 21B12 y 1 grupo de placebo Q2W se enmascararon entre sí y los 3 grupos de dosis Q4W y 1 grupo de placebo Q4W se enmascararon entre sí. No hubo enmascaramiento respecto de ezetimibe. La visita al final del estudio y la última estimación de los lípidos fue en la semana 12 para los sujetos en la pauta Q4W IP o en tratamiento con ezetimibe y la semana 14 para sujetos en la pauta Q2W IP.

Fueron elegibles para este estudio hombres y mujeres con edades de ≥ 18 a ≤ 75 años. El LDL-C en ayunas fue ≥ 100 mg/dl (2,6 mmol/L) y < 190 mg/dl (4,9 mmol/L) y los triglicéridos en ayunas ≤ 400 mg/dl (4,5 mmol/L) según el laboratorio central en la evaluación inicial. Los sujetos tenían una puntuación de riesgo de Framingham del National Cholesterol Education Panel Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) del 10 % o menos.

El criterio de valoración primario fue el porcentaje de cambio respecto del valor inicial en el LDL-C en la semana 12. Los criterios de valoración secundarios incluyeron los porcentajes de cambio en la apolipoproteína B (ApoB), lipoproteína a (Lp(a)) y en la relación de colesterol total a colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad (HDL-C). También se evaluaron la tolerabilidad y seguridad.

Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial en el LDL-C del 41,21 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial en el LDL-C del 45,44 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial en el LDL-C del 51,56 % (datos no mostrados).

Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q4W) tuvieron un porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial en el LDL-C del 37,53 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados

con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial en el LDL-C del 42,16 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial en el LDL-C del 47,52 % (datos no mostrados).

Los datos finales demostraron que en la semana 12, los sujetos que recibieron 21B12 tuvieron un porcentaje de medio de reducción de mínimos cuadrados (LS) respecto del valor inicial en el LDL-C de hasta el 51 % (tabla 12); el porcentaje medio de reducción respecto del valor inicial para ezetimibe fue del 14 %. El cambio respecto del valor inicial hasta la semana 12 fue de hasta 72 mg/dl mayor con 21B12 que con placebo. Los sujetos que recibieron 21B12 tuvieron reducciones de LDL-C respecto del valor inicial un 37 %-53 % mayor que con placebo y un 37 % mayor que con ezetimibe. Las reducciones medias respecto del valor inicial para ApoB (hasta un 44 %), Lp(a) (hasta un 29 %) y la relación de colesterol total/HDL (hasta un 38 %) fueron mayores con 21B12 que con placebo.

TABLA 12:

Porcentaje de cambio respecto del valor inicial en el LDL-C en la semana 12: 21B12 SC frente a ezetimibe o placebo									
	Q2W				Q4W				Ezetimibe QD (N=45)
	Placebo (N=45)	70 mg (N=45)	105 mg (N=46)	140 mg (N=45)	Placebo (N=45)	280 mg (N=45)	350 mg (N=45)	420 mg (N=45)	
Porcentaje medio de cambio de mínimos cuadrados respecto del valor inicial (%)	-3,71	-40,98	-43,87	-50,93	4,54	-39,02	-43,20	-47,98	-14,26
Diferencia de tratamiento frente a placebo (%)	-	-37,27*	-40,17*	-47,23*	-	-43,57*	-47,74*	-52,53*	-
Diferencia de tratamiento frente a ezetimibe (%)		-26,73*	-29,62*	-36,68*		-25,17*	-29,34*	-34,14*	
SC: subcutánea Q2W: cada 2 semanas; Q4W: cada 4 semanas o una vez al mes; QD: a diario * P < 0,001									

ES 2 810 907 T3

EJEMPLO 25

Un estudio con doble enmascaramiento, aleatorizado, controlado por placebo de búsqueda de dosis para evaluar la tolerabilidad y eficacia de un anticuerpo humano anti-PCSK9 en el LDL-C en combinación con inhibidores de HMG-Co-A reductasa en pacientes hipercolesterolémicos

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto a las 12 semanas del anticuerpo humano anti-PCSK9 (anticuerpo monoclonal 21B12) por vía subcutánea (SC) cada 2 semanas (Q2W) o cada 4 semanas (Q4W) en comparación con placebo, en el porcentaje de cambio respecto del valor inicial en el colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad (LDL-C) cuando se usa además de un inhibidor de HMG-Co-A reductasa (por ejemplo, una estatina) en sujetos con hipercolesterolemia.

Este estudio es un ensayo clínico con doble enmascaramiento, aleatorizado, estratificado, controlado por placebo de búsqueda de dosis de grupos paralelos para el anticuerpo humano anti-PCSK9, anticuerpo monoclonal, 21B12, que reclutó a 631 sujetos. Los sujetos en tratamiento con dosis estables durante al menos 4 semanas de terapia con estatinas con o sin ezetimibe y que cumplen todos los criterios de inclusión/exclusión se asignarán aleatoriamente con una asignación igual en 8 grupos de tratamiento: anticuerpo monoclonal, 21B12 por vía subcutánea (SC) (70 mg Q2W, 105 mg Q2W, 140 mg Q2W, 280 mg Q4W, 350 mg Q4W y 420 mg Q4W, placebo Q2W SC o placebo Q4W SC). La asignación aleatoria se estratificará detectando sistemáticamente según el nivel de LDL-C (< 130 mg/dl [3,4 mmol/L] frente a ≥ 130 mg/dl) y uso de ezetimibe en la evaluación inicial (sí frente a no). La asignación aleatoria debe producirse antes de 5 -10 días de la evaluación de detección sistemática de LDL-C usada para determinar la elegibilidad. Las visitas del estudio son cada 2 semanas, independientemente de que el sujeto recibiese el tratamiento Q2W SC o Q4W. Los 3 grupos de dosis Q2W de anticuerpo monoclonal, 21B12 y 1 grupo de placebo Q2W se enmascararán entre sí y los 3 grupos de dosis Q4W y 1 grupo de placebo Q4W se enmascararán entre sí. La visita al final del estudio y la última estimación de los lípidos es en la semana 12 para los sujetos en la pauta Q4W IP y la semana 14 para sujetos en la pauta Q2W IP.

Son elegibles para este estudio hombres y mujeres con edades de ≥ 18 a ≤ 80 años. Para el reclutamiento, los sujetos han de estar en tratamiento con una estatina, con o sin ezetimibe, con dosis estables durante al menos 4 semanas antes de la detección sistemática de LDL-C y que no requieren aumento de la valoración. El LCL-C en ayunas en la detección sistemática ha de ser ≥ 85 mg/dl (2,2 mmol/L). Se limitará el reclutamiento de sujetos con LDL-C en ayunas en la detección sistemática entre ≥ 85 mg/dl (2,2 mmol/L) y < 100 mg/dl (2,6 mmol/L) a no más de aproximadamente un 20 % del reclutamiento total planeado. Los triglicéridos en ayunas han de ser ≤ 400 mg/dl (4,5 mmol/L) determinados por el análisis del laboratorio central en la detección sistemática.

Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 39,22 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 56,38 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 68,76 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 21,17 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 33,41 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 33,87 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 21,17 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 6,80 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 8,43 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 14,84 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 12,75 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 45,14 % (datos no mostrados). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 7,20 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 5,65 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 17,60 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 36,20 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 51,20 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 64,61 % (datos no mostrados). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 70 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un

porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 26,33 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 105 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 36,91 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 140 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 46,17 % (datos no mostrados).

Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q4W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 42,62 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 56,84 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el LDL-C del 52,19 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 22,54 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 29,43 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en Lp(a) del 23,29 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 2,17 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 6,92 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de aumento de LS respecto del valor inicial en el HDL-C del 7,42 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 18,12 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 20,89 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el VLDL-C del 28,66 % (datos no mostrados). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 6,75 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 9,17 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en los triglicéridos del 11,13 % (datos no mostrados). Los datos primarios demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 38,89 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 50,83 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el no-HDL-C del 48,54 % (datos no mostrados). Los datos preliminares demostraron que los sujetos tratados con 280 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 28,08 % al final del intervalo de dosificación; los sujetos tratados con 350 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 36,04 % al final del intervalo de dosificación; y los sujetos tratados con 420 mg de 21B12 (Q2W) tuvieron un porcentaje medio de reducción de LS respecto del valor inicial en el colesterol total del 42,76 % (datos no mostrados).

EJEMPLO 26

Las ABP dirigidas contra PCSK9 regularon positivamente además el LDLR en presencia de estatinas

Este ejemplo demuestra que las ABP dirigidas contra PCSK9 produjeron aumentos adicionales en la disponibilidad de LDLR cuando se usaron en presencia de estatinas, lo que demuestra que pueden lograrse beneficios adicionales mediante el uso combinado de los dos.

Se sembraron células HepG2 en DMEM con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y se cultivaron hasta una confluencia de ~90 %. Las células se trataron con las cantidades indicadas de mevinolina (una estatina, Sigma) y las ABP dirigidas contra PCSK9 (FIG. 12A-12C) en DMEM con FBS al 3 % durante 48 horas. Se prepararon listados de células totales. Se separaron 50 mg de las proteínas totales mediante electroforesis en gel y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se llevaron a cabo inmunotransferencias usando anticuerpo de conejo anti-receptor de LDL humano (Fitzgerald) o anticuerpo de conejo anti-b-actina humana. Los resultados quimioluminiscentes mejorados se muestran en los paneles superiores de las FIG. 12A-12C. Se cuantificó la intensidad de las bandas mediante el programa informático ImageJ y se normalizaron respecto de la b-actina. Se muestran los niveles relativos de LDLR en los paneles inferiores de las FIG. 12A-12C. Las ABP 21B12 y 31H4 son anticuerpos neutralizantes de PCSK9, mientras que 25A7.1 es un anticuerpo no neutralizante.

También se crearon células HepG2-PCSK9. Estas eran una línea celular HepG2 estable transfectada con PCSK9 humana. Las células se sembraron en DMEM con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y se cultivaron hasta una confluencia de -90 %. Las células se trataron con las cantidades indicadas de mevinolina (Sigma) y las ABP dirigidas contra PCSK9 (FIG. 12D-12F) en DMEM con FBS al 3 % durante 48 horas. Se prepararon listados de células totales.

Se separaron 50 mg de las proteínas totales mediante electroforesis en gel y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se llevaron a cabo inmunotransferencias usando anticuerpo de conejo anti-receptor de LDL humano (Fitzgerald) o anticuerpo de conejo anti-b-actina humana. Los resultados quimioluminiscentes mejorados se muestran en los paneles superiores. Se cuantificó la intensidad de las bandas mediante el programa informático ImageJ y se normalizaron respecto de la b-actina.

Como puede observarse en los resultados presentados en las FIG. 12A-12F, las cantidades crecientes del anticuerpo neutralizante y las cantidades crecientes de la estatina generalmente dieron como resultado aumentos en el nivel de LDLR. Este aumento de la eficacia para aumentar los niveles de la ABP es especialmente evidente en las FIG. 12D-12F, en las que las células también fueron transfectadas con PCSK9, permitiendo que las ABP demostrasen su eficacia en mayor medida.

Curiosamente, como se demuestra por los resultados en la comparación de las FIG. 12D-12F con 12A-12C, la influencia de las concentraciones de la ABP en los niveles de LDLR aumentó drásticamente cuando las células producían PCSK9. Además, resulta evidente que las ABP neutralizantes (21B12 y 31H4) dieron como resultado un mayor aumento en los niveles de LDLR, incluso en presencia de estatinas, que la ABP 25A7.1 (una no neutralizante), lo que demuestra que pueden obtenerse beneficios adicionales mediante el uso tanto de estatinas como de ABP dirigidas contra PCSK9.

EJEMPLO 27

Secuencias consenso

Se determinaron las secuencias consenso usando análisis filogenéticos estándar de las CDR correspondientes a las V_H y V_L de las ABP anti-PCSK9. Las secuencias consenso se determinaron manteniendo las CDR contiguas en la misma secuencia correspondiente a una V_H o V_L. En resumen, se convirtieron las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios variables completos de V_H o V_L a un formato FASTA para una mayor facilidad de procesado de los alineamientos comparativos e inferencia de filogenias. A continuación, se reemplazaron las regiones marco de estas secuencias con una secuencia enlazadora artificial (marcadores de posición de "bbbbbbbbbb", construcción de ácido nucleico no específica) de tal forma que se pudo efectuar el examen únicamente de las CDR sin introducir ningún sesgo de ponderación de la posición de aminoácidos debido a eventos coincidentes (por ejemplo, anticuerpos no relacionados que por azar, comparten una herencia de marco de línea germinal común) mientras que siguen manteniendo las CDR contiguas en la misma secuencia correspondiente a una V_H o V_L. Posteriormente, se sometieron las secuencias de V_H o V_L de este formato a una consulta de alineamiento de similitud de secuencia usando un programa que emplea un algoritmo estándar similar a ClustalW (véase, Thompson *et al.*, 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). Se empleó una penalización por creación de hueco de 8,0 junto con una penalización por extensión de hueco de 2,0. Este programa igualmente generó filogramas (ilustraciones de árboles filogenéticos) basados en alineamientos de similitud de secuencia usando o bien UPGMA (método de grupo de par no ponderado usando medias aritméticas) o métodos de unión de vecinos (véase, Saitou y Nei, 1987, Molecular Biology and Evolution 4:406-425) para construir e ilustrar la similitud y la distinción de los grupos de secuencia mediante comparación y agrupamiento de la longitud de la rama. Ambos métodos produjeron resultados similares, pero finalmente se usaron los árboles obtenidos mediante UPGMA ya que el método emplea un conjunto de supuestos más simple y conservativo. Se generaron árboles obtenidos mediante UPGMA cuando se definieron grupos de secuencia similares que tenían menos de 15 sustituciones por cada 100 restos (véase, la leyenda en las ilustraciones de árbol para la escala) entre las secuencias individuales dentro del grupo y se usaron para definir colecciones de secuencia consenso. Los resultados de las comparaciones se representan en las FIG. 13A-13J. En la FIG. 13E, se seleccionaron los grupos de tal forma que las secuencias en la cadena ligera que forman un clado son también un clado en la cadena pesada y tienen menos de 15 sustituciones.

EJEMPLO 28

Preparación de formulaciones de ABP dirigida contra PCSK9

UF/DF - Metodología de ultrafiltración/diafiltración

Se intercambió el tampón de la sustancia farmacológica, por ejemplo, el anticuerpo 21B12 y el anticuerpo 11F1, a tampón de formulación, que incluye estabilizante, con un sistema de UF/DF Millipore TFF que usa un filtro Millipore Pellicon XL, membrana con un tamaño de 50 cm^2 (celulosa regenerada, corte de peso molecular de 30.000). La etapa de diafiltración se llevó a cabo hasta que se intercambiaron al menos diez volúmenes de tampón de diafiltración. Una vez se hubo completado la etapa de diafiltración, se conmutó el sistema de UF/DF a modo ultrafiltración y se concentró cada formulación hasta los niveles de concentración diana.

Tras completarse la etapa de UF/DF, se añadió la cantidad adecuada de polisorbato 20 u 80 a cada formulación a partir de una solución madre recién preparada de polisorbato ("PS") al 1,0 % (p/p) hasta alcanzar la concentración de polisorbato deseada.

Antes de rellenar los envases primarios, se filtró en condiciones asépticas cada formulación bajo una campana de flujo laminar y usando un filtro de 0,2 micrómetros. El rellenado también se llevó a cabo en condiciones asépticas y se llevó a cabo de manera manual o automática usando los instrumentos de relleno adecuados.

Ejemplo 29

Formulaciones de la ABP dirigida contra PCSK9 de alta concentración con viscosidad reducida Para evaluar los efectos de diferentes excipientes en la viscosidad de altas concentraciones de proteína, se usó un ensayo de determinación sistemática de la viscosidad, estabilidad y solubilidad para explorar excipientes moduladores de la viscosidad para formulaciones de proteína de alta concentración. Específicamente, toda la preparación de muestras, por ejemplo, muestras de anticuerpo 21B12, se llevó a cabo de manera aséptica bajo una campana de flujo laminar. La liofilización de las muestras que se iban a ensayar permitió un método sencillo para lograr altas concentraciones de proteína. Se pipetearon 1,5 ml de 70 mg/ml de proteína (por ejemplo, 21B12) en viales de vidrio de 3cc para liofilización. La liofilización se llevó a cabo usando un ciclo de liofilización genético en un liofilizador de laboratorio VirTis. El tampón de liofilización fue L-glutamina 10 mM con sacarosa al 1,0 %, pH 4,8. Las muestras liofilizadas (por ejemplo, muestra de 21B12 liofilizada) se reconstituyeron individualmente con aproximadamente 0,65 ml de tampones y excipientes, mostrados en la tabla 13 a continuación, hasta una concentración final de proteína de 150-200 mg/ml. Las muestras reconstituidas se dejaron reposar durante una noche para permitir una disolución completa. Posteriormente se midió la viscosidad como se describe a continuación.

TABLA 13

Tipo de excipiente	**Nivel de excipiente**	**pH ajustado**
Aminoácidos	L-alanina 150 mM	pH 4,5
	L-glicina 150 mM	pH 4,2
	L-lisina 75 mM	pH 4,2
	L-metionina 150 mM	pH 4,5
	L-prolina 150 mM	pH 4,2
	L-serina 150 mM	pH 4,2
	L-arginina 70 mM	pH 4,5
	L-serina 150 mM	pH 4,4
Sales	Cloruro de magnesio 30 mM	pH 4,2
	Cloruro de sodio 70 mM	pH 4,2
	Cloruro de calcio 30 mM	pH 4,4
	Sulfato de sodio 50 mM	pH 4,1
	Cloruro de cinc 30 mM	pH 4,7
Polioles	Glicerol 150 mM	pH 4,5
	Sacarosa 150 mM	pH 4,2
Otros	Carnitina 150 mM	pH 4,8
	Creatinina 150 mM	pH 5,0
	Taurina 150 mM	pH 4,4

Los resultados de la determinación sistemática de la viscosidad, estabilidad y solubilidad mostraron cambios en la viscosidad de 21B12 después de la adición de varios excipientes (figura 26). No todos los excipientes usados para la determinación sistemática dieron como resultado una reducción de la viscosidad de la solución; La adición de L-alanina, glicerol, sulfato de sodio, sacarosa y cloruro de cinc dio como resultado una viscosidad mucho mayor en comparación con la muestra de control. Varios excipientes usados en la determinación sistemática parecieron ser buenos candidatos para la modulación de la viscosidad, por ejemplo, L-arginina, carnitina, creatinina, L-metionina y taurina.

Para evaluar los efectos de diferentes formulaciones en la viscosidad de una ABP dirigida contra PCSK9 específica, se formularon composiciones de 21B12 en seis formulaciones diferentes mostradas en la tabla 29.2 a continuación. La concentración de 21B12 en todas las formulaciones fue de 134 mg/ml. Las composiciones se rellenaron hasta un volumen final de 1,0 ml en viales. Las composiciones se incubaron a temperatura ambiente (es decir, 25 °C).

Diálisis y concentración de 21B12

Se logró la retirada de sacarosa de 21B12 originalmente en acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9,0 % (p/v) mediante diálisis añadiendo aproximadamente 10 ml de 21B12 a casetes de diálisis Slide-A-Lyzer de Pierce (Rockford, IL) y dializando frente a 2 l de tampón a 4 °C durante 3 ciclos (2 horas x 2 y 16 horas x 1) para el intercambio completo del tampón. El tampón para diálisis contenía acetato de sodio 10 mM (preparado a partir de ácido acético) a pH 5,0. Posteriormente se concentraron todas las muestras usando dispositivos Amicon UltraPrep de Millipore (Billerica, MA) en una centrifugadora Allegra 6R de Beckman Coulter (Fullerton, California) centrifugando a 3000 rpm hasta que el volumen de la muestra era ligeramente menor que el volumen necesario para la concentración deseada.

Después, se llevó a cabo la determinación de la concentración midiendo la absorbancia a A280 usando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Santa Clara, California). La concentración de proteína se calculó usando el coeficiente de extinción adecuado. Después, se añadió la cantidad adecuada de tampón a la muestra para volver a diluirla hasta la concentración deseada y se llevó a cabo otra A280 para obtener la concentración final para el experimento.

Adición de estabilizantes que también pueden actuar para reducir la viscosidad:

Se probaron excipientes, tales como prolina, alcohol bencílico, creatinina, metionina, taurina, etc. con el objetivo de reducir la viscosidad. Estos excipientes se añadieron individualmente a las muestras de formulación de 21B12 a partir de soluciones madre de alta concentración.

Mediciones de la viscosidad

La viscosidad se midió usando un viscosímetro de cono y placa Brookfield LV-DVII (Middleboro, Massachusetts) con un husillo CPE-40 con una temperatura del vaso de muestra emparejada regulada por un baño de agua circulante a una temperatura constante de 25C. Se añadieron 500 ul de muestra al vaso de muestra con un pipeteador de desplazamiento positivo. Después de fijar el vaso de muestra, se aumentó gradualmente la velocidad del husillo hasta que se logró aproximadamente un 80 % de la torsión. En este punto, se detuvo la velocidad rotacional y se generó una lectura de la viscosidad mediante el programa informático Rheocalc.

TABLA 14

Tampón	Estabilizante	Estabilizante/excipientes añadidos para reducir la viscosidad	Viscosidad (cP)
Acetato de Na 10 mM			42,4
Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	L-prolina al 2 % (174 mM)	20,3
Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	L-prolina al 3 % (261 mM)	17,9
Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	Alcohol bencílico al 3 %	17,8
Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	Creatinina 150 mM	11,97
Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	L-metionina 150 mM	16,0
Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	L-taurina 150 mM	16,8

Los resultados demuestran que la L-prolina, alcohol bencílico, creatinina, metionina y taurina tenían un efecto reductor de la viscosidad significativo en las concentraciones elevadas de la ABP dirigida contra PCSK9, 21B12 (véase la tabla 14).

Para evaluar adicionalmente los efectos de diferentes formulaciones en una ABP dirigida contra PCSK9 específica, se formularon las composiciones de 21B12 en diferentes formulaciones mostradas en la tabla 15 a continuación. Las formulaciones se agrupan en tres grupos: (1) un conjunto de diversas concentraciones de 21B12 en tampón acetato de sodio 10 mM, pH 5,2, (2) un conjunto de diversas concentraciones de 21B12 en tampón acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 con L-prolina al 3 % (aproximadamente 261 mM) añadida a cada muestra y (3) un conjunto de muestras de 21B12 concentradas a aproximadamente 117-134 mg/ml en tampón de acetato de sodio 10 mM a diferentes niveles de pH (de 4,0 a 5,5) más dos muestras en tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,2 con adición de o bien NaCl o una combinación de L-metionina/alcohol bencílico.

TABLA 15

Conc. de 21B12 (mg/ml)	Formulación	Excipientes adicionales	Viscosidad (cP) a 25 °C	Viscosidad (cP) a 40 °C	Osmolalidad (mOsmol/kg)
76	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**N/D**	**2,84**		**53**
104	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**N/D**	**7,1**		**57**
126	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**N/D**	**16**	**8,9**	**58**
154	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**N/D**	**101**	**49**	**No se congeló**
73	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**+ prolina al 3 %**	**2,3**		**253**
104	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**+ prolina al 3 %**	**5**		**252**
122	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**		**8,8**		**274**
148	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**+ prolina al 3 %**	**24,4**	**9,5**	**301**
125	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,2**	**+ NaCl 150 mM**	**11**	**6,6**	**346**
134	**Acetato de Na 10 mM, pH 4**	**N/D**	**13,3**	**8,87**	**59**
117	**Acetato de Na 10 mM, pH 4,5**	**N/D**	**10,8**	**6**	**59**
130	**Acetato de Na 10 mM, pH 5**	**N/D**	**16,2**	**7,1**	**59**
133	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,5**	**N/D**	***23***	**12,6**	**64**
134	**Acetato de Na 10 mM, pH 5,5**	**+ metionina 150 mM y alcohol bencílico al 3 %**	**6,5**		**520**

Los resultados mostraron que la L-prolina tuvo un efecto reductor de la viscosidad significativo a altas concentraciones de la ABP dirigida contra PCSK9, 21B12 (véase la figura 27).

Para evaluar aún más los efectos de diferentes formulaciones en una ABP dirigida contra PCSK9 específica, se formularon las composiciones de 21B12 en diferentes formulaciones mostradas en la tabla 16 a continuación.

TABLA 16

Conc. de 21B12 (mg/ml)	Formulación	Excipientes	Viscosidad (cP) a 25 °C	Osmolalidad (mOsmol/kg)
116	acetato de sodio 10 mM, pH 4,8	N/D	10,4	72
116	acetato de sodio 10 mM, pH 4,8	metionina 50 mM + alcohol bencílico al 2 %	7	329
116	acetato de sodio 10 mM, pH 4,8	arginina 150 mM	3,7	241
116	acetato de sodio 10 mM, pH 4,8	prolina al 2 % + alcohol bencílico al 1 %	7	313
116	acetato de sodio 10 mM, pH 4,8	prolina al 1,5 % + alcohol bencílico al 1 %	7,3	277

Los resultados muestran que las formulaciones de 21B12 formuladas con un 1,5 % o 2,0 % de prolina (aproximadamente 131 nM - 174 mM de prolina) y alcohol bencílico al 1 % tuvieron un efecto reductor de la viscosidad significativo a altas concentraciones de la ABP dirigida contra PCSK9, 21B12.

Para evaluar aún más los efectos de diferentes formulaciones en una ABP dirigida contra PCSK9 específica, se formularon las composiciones de 21B12 en diferentes formulaciones mostradas en la tabla 17 a continuación.

TABLA 17:

Tampones y excipientes finales	Conc. final media de 21B12 A280 (mg/ml)	Viscosidad (cP) a 25C	Tensión de cizalladura (Pa) a 25C	Velocidad de cizalladura (1/s) a 25C
n.º 1 acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, pH 5,2	79	**3,43**	**18,50**	**540**
	96	**4,97**	**18,60**	**375**
	110	**7,68**	**18,44**	**240**
	166	**223,19**	**18,40**	**8,25**
n.º 2 acetato de sodio 10 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 3 %, pH 5,0	89	**4,80**	**18,00**	**375**
	105	**5,97**	**18,30**	**307,5**
	122	**9,10**	**18,40**	**202,5**
	150	**19,31**	**18,80**	**97,5**
	167	**40,10**	**18,10**	**45**
	195	**193,80**	**18,90**	**9,75**
n.º 3 acetato de sodio 10 mM, metionina 100 mM, sacarosa al 4 %, pH 5,0	85	**3,20**	**18,00**	**562,5**
	106	**4,89**	**18,30**	**375**
	122	**7,85**	**18,90**	**240**
	139	**13,55**	**18,30**	**135**
	168	**121,22**	**18,20**	**15**
	193	**309,56**	**18,60**	**6**
n.º 4 acetato de sodio 10 mM, prolina 250 mM, pH 5,0	85	**3,20**	**18,00**	**562,5**
	108	**4,57**	**18,85**	**412,5**
	125	**7,61**	**18,27**	**240**
	139	**13,54**	**18,30**	**135**
	180	**133,73**	**19,00**	**14,3**
	203	**323,35**	**19,40**	**6**

Los resultados muestran la capacidad para lograr altas concentraciones de proteína 21B12 teniendo viscosidad reducida con formulaciones que tienen estabilizantes/excipientes específicos (véanse las figuras 28A-28D). Específicamente, La figura 28A es una gráfica que muestra la viscosidad de varias concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C.

La figura 28B es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende acetato de sodio 10 mM, arginina 125 mM y sacarosa al 3 % a pH 5,0 a 25 °C y 40 °C.

La figura 28C es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende acetato de sodio 10 mM, metionina 100 mM y sacarosa al 4 % a pH 5,0 a 25 °C y 40 °C.

La figura 28D es un diagrama de barras que muestra la viscosidad de diversas concentraciones de anticuerpo anti-PCSK9, 21B12, en una formulación que contiene acetato de sodio 10 mM y sacarosa al 9 % a pH 5,2 a 25 °C y 40 °C, en comparación con una formulación que comprende acetato de sodio 10 mM y prolina 250 mM, a pH 5,0 a 25 °C y 40 °C.

EJEMPLO 30

Estudios de viscosidad de alta concentración de 11F1

La tabla 30 muestra la viscosidad del anticuerpo 11F1 a 25 grados centígrados a diversas concentraciones de anticuerpo y en diversas formulaciones.

Se preparó solución madre de 11F1 de alta concentración de un modo similar al descrito para 21B12 en el ejemplo 29 anterior. Después, se llevó a cabo la determinación de la concentración midiendo la absorbancia a A280 usando un espectrofotómetro Agilent 8453 (Santa Clara, California). La concentración de proteína se calculó usando el coeficiente de extinción adecuado. Después, se añadió la cantidad adecuada de tampón a la muestra para volver a diluirla hasta la concentración deseada y se llevó a cabo otra A280 para obtener la concentración final para el experimento. Los excipientes se añadieron individualmente a las muestras de las formulaciones de 11F1 procedentes de las soluciones madre de alta concentración.

La viscosidad se midió usando un viscosímetro de cono y placa Brookfield LV-DVII (Middleboro, Massachusetts) con un husillo CPE-40 con una temperatura del vaso de muestra emparejada regulada por un baño de agua circulante a una temperatura constante de 25 °C. Se añadieron 500 µl de muestra a un vaso de muestra con un pipeteador de desplazamiento positivo. Después de fijar el vaso de muestra, se aumentó gradualmente la velocidad del husillo hasta que se logró aproximadamente un 80 % de la torsión. En este punto, se detuvo la velocidad rotacional y se generó una lectura de la viscosidad mediante el programa informático Rheocalc.

En ocasiones, las formulaciones con alta concentración de proteína se midieron usando un tipo de viscosímetro distinto, un viscosímetro Anton Paar Physica Modelo MCR300 con un husillo CP50-1. En este instrumento se usó una muestra de 600 µl y se usó el programa informático Rheoplus, versión 3.4 para calcular la viscosidad de la solución. No hubo grandes diferencias en las mediciones usando cualquiera de los dos viscosímetros.

TABLA 30

Tampones y excipientes finales	Conc. final media de 11F1 A280 (mg/ml)	Viscosidad (cP) a 25C
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, polisorbato ("PS") 20 al 0,01 %, pH 5,2	133	**8**
	145	**14**
	172	**23**
	186	**45**
	191	**53**
	224	**133**
acetato de sodio 10 mM, metionina 150 mM, sacarosa al 3 %, PS 20 al 0,01 %, pH 5,2	147	**13**
	162	**18**
	192	**31**
	212	**54**
acetato de sodio 10 mM, prolina 250 mM, PS 20 al 0,01 %, pH 5,0	139	**10**
	170	**18**
	196	**36**
	212	**47**
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, arginina 100 mM, pH 5,2	211	26
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, 150 mM	211	62
cloruro de sodio, pH 5,2		
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, glicina 150 mM, pH 5,2	211	45
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, serina 150 mM, pH 5,2	211	48
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, alanina 150 mM, pH 5,2	211	43
acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 %, pH 5,2	211	73
acetato de sodio 10 mM, pH 5,2	211	58

Los resultados mostrados en la tabla 30 demuestran la capacidad para lograr altas concentraciones del anticuerpo 11F1 con una viscosidad relativamente baja en formulaciones que tienen estabilizantes/excipientes específicos. Las formulaciones que comprendían los estabilizantes metionina, prolina, arginina, glicina, serina y alanina mostraron una viscosidad particularmente más baja.

EJEMPLO 31

Estudio de estabilidad de formulaciones de la ABP dirigida contra PCSK9 a alta concentración

Para evaluar los efectos en la estabilidad de las formulaciones con alta concentración de proteína de la ABP dirigida contra PCSK9, se formularon las composiciones de 21B12 en diferentes formulaciones mostradas en la tabla 31.1 a continuación. Las formulaciones se incubaron en los envases indicados a -30 °C o 4 °C durante 0 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses y 1 año. Para cada formulación en cada punto de tiempo,

se retiró una muestra de cada envase para monitorizar el monómero de anticuerpo mediante HPLC de exclusión por tamaños nativa (SEC-HPLC) y detección de las partículas subvisibles mediante oscurecimiento de luz (HIAC).

Tabla 31.1

Formulaciones	Conc. de 21B12 (mg/ml)	Vol. de relleno (ml)	Envase	Tampón	Excipientes	Polisorbato 80	pH diana
1	110	3,0	Vial de 5cc	Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	0,010 %	5,2
2	120	3,0	Vial de 5cc	Acetato de Na 10 mM	Metionina 100 mM, sacarosa al 4 %	0,010 %	5,0
3	120	3,0	Vial de 5cc	Acetato de Na 10 mM	Prolina 250 mM	0,010 %	5,0
4	110	1,0	Jeringa de vidrio BD	Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	0,010 %	5,2
5	120	1,0	Jeringa de vidrio BD	Acetato de Na 10 mM	Metionina 100 mM, sacarosa al 4 %	0,010 %	5,0
6	120	1,0	Jeringa de vidrio BD	Acetato de Na 10 mM	Prolina 250 mM	0,010 %	5,0
7	110	1,2	Jeringa de plástico CZ	Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	0,010 %	5,2
8	120	1,2	Jeringa de plástico CZ	Acetato de Na 10 mM	Metionina 100 mM, sacarosa al 4 %	0,010 %	5,0
9	120	1,2	Jeringa de plástico CZ	Acetato de Na 10 mM	Prolina 250 mM	0,010 %	5,0

SEC-HPLC:

La SEC-HPLC separa las proteínas basándose en las diferencias en sus volúmenes hidrodinámicos. Las moléculas con mayores volúmenes hidrodinámicos de proteína se eluyen más temprano que las moléculas con menores volúmenes. La SEC-HPLC nativa se llevó a cabo usando una columna TSK-GEL G3000SWXL de 7,8 mm x 300 mm

(Tosoh Bioscience), con un tamaño de partícula de 5 µm, en un dispositivo HPLC Agilent con un detector de longitud de onda variable. La fase móvil fue fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 6,8 ± 0,1. El caudal fue de 0,5 ml/minuto. El eluato de la columna se monitorizó a 280 nm. Las áreas de pico integradas en los cromatogramas se usaron para cuantificar las cantidades de monómero y de especies de alto peso molecular.

Tabla 31.2:

	%HMW a -30C				%HMW a 4C					
Formulaciones	T=0	T=1M	T=6M	T=1A	T=0	T=1M	T=2M	T=3M	T=6M	T=1A
1	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,01	0,03	0,06	0,07
2	0,06	0,15	0,12	0,15	0,06	0,06	0,03	0,05	0,06	0,06
3	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,07
4	0,04	0,05	0,09	0,05	0,04	0,05	0,01	0,04	0,06	0,09
5	0,06	0,20	0,24	0,21	0,06	0,06	0,03	0,05	0,01	0,07
6	0,04	0,04	0,1	0,05	0,04	0,03	0,01	0,03	0,1	0,07
7	0,04	0,04	0,09	0,06	0,04	0,05	0,01	0,03	0,07	0,09
8	0,06	0,18	0,19	0,17	0,06	0,06	0,03	0,05	0,1	0,06
9	0,04	0,04	0,02	0,05	0,04	0,04	0,01	0,03	0,06	0,08

La tabla 31.2 muestra los resultados del análisis de SEC-HPLC nativa de las formulaciones de 21B12 listadas en la tabla 31.1 incubadas a X °C durante 0 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses. "% EPM" refleja la cantidad de monómero de 21B12 de elevado peso molecular en una muestra. Estos resultados indican que no se observaron problemas de formulación después de 6 meses; sin embargo, hubo cierto aumento de las especies de elevado peso molecular en la formulación de metionina (es decir, las formulaciones 2, 5 y 8).

Detección de partículas subvisibles mediante oscurecimiento de luz (HIAC):

Un sistema electrónico de recuento de partículas portadas en líquido (HIAC/Royco 9703 o equivalente) que contiene un sensor de oscurecimiento de luz (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un muestreador de líquidos cuantifica el número de partículas y su intervalo de tamaño en una muestra de ensayo dada. Cuando las partículas en un líquido pasan entre la fuente de luz y el detector, disminuyen u "oscurecen" el haz de luz que recae en el detector. Cuando la concentración de las partículas se encuentra dentro del intervalo normal del sensor, estas partículas se detectan de una en una. El paso de cada partícula a través de la zona de detección reduce la luz incidente sobre el fotodetector y se reduce momentáneamente la salida de voltaje del fotodetector. Los cambios en el voltaje se registran como pulsos eléctricos que se convierten por el instrumento en el número de partículas presentes. El método es no específico y mide las partículas independientemente de su origen. Los tamaños de partícula que se monitorizaron fueron de 10 µm y 25 µm.

En este ejemplo, se llevó a cabo el análisis de HIAC usando muestras que se habían almacenado a 4 °C. Específicamente, se sometieron muestras de las formulaciones de 21B12 en la tabla 31.1 a vacío (también llamado "desgasificado") para retirar las burbujas de aire que pudieran detectarse como partículas en el sistema de recuento de partículas. Para las muestras de 21B12, el método fue someter a las muestras a vacío a 75 torr durante 1 a 2 horas. El recuento de partículas se llevó a cabo antes de 2 horas después de que se completase el proceso de desgasificación.

Las figuras 29A y 29B muestran los resultados de los ensayos de HIAC para las formulaciones anteriormente identificadas incubadas en envases durante 0 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses y 6 meses. Se contaron partículas de 10 µm y 25 µm. Las figuras 29A y 29B demuestran que todas las formulaciones de 21B12 eran estables, como se midió con HIAC. Aunque las formulaciones en jeringas de vidrio, es decir, las formulaciones 4-6, mostraron mayores niveles de partículas entre todas las concentraciones de proteína y formulaciones, los recuentos de partículas se encuentran por debajo de los límites USP para cada tamaño de partícula (10 µm y 25 µm). Los límites USP para las partículas de 10 µm es de 6000 por envase y para las partículas de 25 µm, 600 por envase.

EJEMPLO 32

Estudios de estabilidad de 11F1

Para estudiar las formulaciones de alta concentración (150 mg/ml) de 11F1, se prepararon varias formulaciones usando excipientes candidatos como se indican en la tabla 32A a continuación. Las formulaciones se almacenaron en

los envases indicados a -30 °C o 4 °C durante al menos seis meses.

Tabla 32A: Formulaciones estudiadas

Nombre de la formulación	Conc. diana (mg/ml)	Recipiente	Tampón"	Excipientes diana	Polisorbato 20	pH final[c]
1	150	Vial de vidrio de 5cc	Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	0,010 %	5,2
2	150	Jeringa de vidrio BD	Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	0,010 %	5,2
3	150	Jeringa de vidrio BD	Acetato de Na 10 mM	metionina 150 mM, Sacarosa al 3 %	0,010 %	5,2
4	150	Jeringa de vidrio BD	Acetato de Na 10 mM	prolina 250 mM	0,010 %	5,2
5	150	Jeringa de plástico CZ	Acetato de Na 10 mM	Sacarosa al 9,0 %	0,010 %	5,2
6	150	Jeringa de plástico CZ	Acetato de Na 10 mM	metionina 150 mM, Sacarosa al 3 %	0,010 %	5,2
7	150	Jeringa de plástico CZ	Acetato de Na 10 mM	prolina 250 mM	0,010 %	5,2

Se evaluó el % de especies de EPM mediante HPLC de exclusión por tamaños después de su almacenamiento a -30 °C y 4 °C en los puntos de tiempo indicados en la tabla 32B a continuación. En resumen, La HPLC de exclusión por tamaños HPLC separa las proteínas basándose en las diferencias en sus volúmenes hidrodinámicos. Las moléculas con mayores volúmenes hidrodinámicos de proteína se eluyen más temprano que las moléculas con menores volúmenes. La SEC-HPLC nativa se llevó a cabo usando una columna TSK-GEL G3000SWXL de 7,8 mm x 300 mm (Tosoh Bioscience), con un tamaño de partícula de 5 µm, en un dispositivo HPLC Agilent con un detector de longitud de onda variable. La fase móvil fue fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 6,8 +/- 0,1. El caudal fue de 0,5 ml/minuto. El eluato de la columna se monitorizó a 280 nm. Las áreas de pico integradas en los cromatogramas se usaron para cuantificar las cantidades de monómero y de especies de alto peso molecular.

TABLA 32 B

% EPM a -30 °C			% EPM a 4 °C			
Formulaciones	T=0	T=4M	T=0	T=2M	T=4M	T=6M
1_	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
2_	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,02
3_	0,07	0,26	0,07	0,07	0,07	0,06
4_	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,08
5_	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,06
6_	0,06	0,32	0,06	0,06	0,06	0,06
-	0,08	0,07	0,08	0,06	0,07	0,08

La tabla 32B muestra los resultados del análisis de SEC-HPLC nativa de las formulaciones de 11F1 listadas en la tabla 32A incubadas a 4 °C o -30 °C durante 0 semanas, 2 meses, 4 meses o 6 meses. "% EPM" refleja la cantidad de 11F1 de elevado peso molecular en una muestra. Estos resultados indican que no se observaron problemas de formulación hasta 6 meses, aunque algunas especies de elevado peso molecular aumentaron en las formulaciones de metionina almacenadas a -30 °C (es decir, las formulaciones 3 y 6).

Se evaluó la estabilidad de formulaciones adicionales de 11F1 de alta concentración preparando las formulaciones en

los envases primarios indicados en la tabla 32C a continuación:

Tabla 32 C

Formulación	Conc. de 11F1 (mg/ml)	Envase primario	Excipientes	Polisorbato al 0,010 %	Tampón	pH final
10	150	Viales de vidrio	Sacarosa al 9,0 %	PS 20	Acetato de Na 10 mM	5,2
20	150	Viales de vidrio	Sacarosa al 9,0 %	PS 80	Acetato de Na 10 mM	5,2
30	180	Jeringa de vidrio BD	metionina 150 mM, Sacarosa al 3 %	PS 20	Acetato de Na 10 mM	5,2
40	180	Jeringa de vidrio BD	MET 150 mM, Sacarosa al 3 %	PS 80	Acetato de Na 10 mM	5,2
50	180	Jeringa de vidrio BD	Prolina 250 mM	PS 20	Acetato de Na 10 mM	5,2
60	180	Jeringa de vidrio BD	prolina 250 mM	PS 80	Acetato de Na 10 mM	5,2
70	180	Jeringa de plástico CZ	metionina 150 mM, Sacarosa al 3 %	PS 20	Acetato de Na 10 mM	5,2
80	180	Jeringa de plástico CZ	metionina 150 mM, Sacarosa al 3 %	PS 80	Acetato de Na 10 mM	5,2
90	180	Jeringa de plástico CZ	prolina 250 mM	PS 20	Acetato de Na 10 mM	5,2
100	180	Jeringa de plástico CZ	prolina 250 mM	PS 80	Acetato de Na 10 mM	5,2

Las formulaciones se incubaron a 4 °C durante un año. En los puntos de tiempo indicados en la tabla 32D a continuación, se retiró una muestra de cada envase y se analizó mediante SEC-HPLC como se describe para la tabla 32B anterior.

Tabla 32D

Exclusión por tamaños % de formas de EPM después de 1 año de almacenamiento a 4 °C								
4 °C % EPM								
Formulaciones	**T=0**	**T=2wk**	**T=4wk**	**T=6wk**	**T=6M**	**T=6.5M**	**T=1Yr**	**% de cambio**
10	0,04	0,07	0,08	0,06	0,07	N/D	0,07	0,03
20	0,05	0,07	0,07	0,07	0,06	N/D	0,06	0,01
30	0,08	0,14	N/D	N/D	N/D	N/D	0,05	-0,03
40	0,09	0,15	0	N/D	N/D	N/D	0,06	-0,03
50	0,08	0,15	0	0	N/D	N/D	0,07	-0,01
60	0,07	0,16	0	0	N/D	N/D	0,08	0,01
70	0,08	0,14	0	0	N/D	0,09	0,06	-0,02
80	0,07	0,14	0	0	N/D	N/D	0,07	0,00
90	0,09	0,15	0	0	N/D	0,09	0,05	-0,04
100	0,08	0,15	0	0	N/D	N/D	0,08	0,00

En los puntos de tiempo indicados en la tabla 32E a continuación, se retiró una muestra de cada envase y se analizó mediante HPLC de intercambio catiónico (CEX-HPLC). La HPLC de intercambio catiónico separa las proteínas

basándose en las diferencias en su carga de superficie. A un pH determinado, las isoformas cargadas de 11F1 se separan en una columna de intercambio catiónico y se eluyen usando un gradiente salino. El eluyente se monitoriza mediante absorbancia UV. La distribución de isoformas cargadas se evalúa determinando el área de pico de cada isoforma como un porcentaje del área de pico total.

La CEX-HPLC nativa se llevó a cabo usando una columna Dionex G3000SWXL de 4,0 mm de DI x 250 mm (Tosoh Bioscience), con un tamaño de partícula de 10 µm, en un dispositivo HPLC Agilent con un detector de longitud de onda variable. La fase móvil fue un gradiente lineal de MES 20 mM, pH 6,0 +/-0,1 y el mismo tampón con cloruro de sodio 500 mM. El caudal fue de 0,6 ml/minuto. El eluato de la columna se monitorizó a 280 nm. Se usaron las áreas de pico integradas en los cromatogramas para cuantificar las cantidades de las isoformas diferentemente cargadas.

Tabla 32E

HPLC de intercambio catiónico % de pico de la isoforma principal después de 1 año de almacenamiento a 4 °C						
4 °C % de pico de la isoforma principal						
Formulación	**T=0**	**2S**	**4S**	**6S**	**1A**	**% de cambio**
10	76,0	75,9	75,7	75,6	76,2	**0,3**
20	76,0	76,4	75,7	75,6	76,4	**0,5**
30	76,0	N/D	N/D	N/D	76,3	**0,4**
40	75,8	N/D	N/D	N/D	76,0	**0,2**
50	76,0	N/D	N/D	N/D	76,3	**0,4**
60	75,8	N/D	N/D	N/D	75,8	**0,1**
70	75,9	N/D	N/D	N/D	76,2	**0,5**
80	76,1	N/D	N/D	N/D	76,3	**0,3**
90	76,0	N/D	N/D	N/D	76,0	**0,0**
100	75,8	N/D	N/D	N/D	75,9	**0,0**

Las tablas tanto 32D como 32E demuestran que las formulaciones de 11F1 descritas mostraron un aumento menor del 5 % en el % EPM (SEC-HPLC) o una variación menor del 3-5 % en el pico de la isoforma principal (HPLC CATIÓNICA) tras hasta 1 año de almacenamiento a 4 °C. De hecho, los cambios en ambos parámetros fueron muy bajos, lo que es indicativo de formulaciones altamente estables.

Detección de partículas subvisibles mediante oscurecimiento de luz (HIAC):

Un sistema electrónico de recuento de partículas portadas en líquido (HIAC/Royco 9703 o equivalente) que contiene un sensor de oscurecimiento de luz (HIAC/Royco HRLD-150 o equivalente) con un muestreador de líquidos cuantifica el número de partículas y su intervalo de tamaño en una muestra de ensayo dada. Cuando las partículas en un líquido pasan entre la fuente de luz y el detector, disminuyen u "oscurecen" el haz de luz que recae en el detector. Cuando la concentración de las partículas se encuentra dentro del intervalo normal del sensor, estas partículas se detectan de una en una. El paso de cada partícula a través de la zona de detección reduce la luz incidente sobre el fotodetector y se reduce momentáneamente la salida de voltaje del fotodetector. Los cambios en el voltaje se registran como pulsos eléctricos que se convierten por el instrumento en el número de partículas presentes. El método es no específico y mide las partículas independientemente de su origen. Los tamaños de partícula que se monitorizaron fueron de 10 µm y 25 µm.

En este ejemplo, se llevó a cabo el análisis de HIAC usando muestras que se habían almacenado a 4 °C. Específicamente, se sometieron muestras de las formulaciones de 11F1 en la tabla 32a a vacío (también llamado "desgasificado") para retirar las burbujas de aire que pudieran detectarse como partículas en el sistema de recuento de partículas. Para las muestras de 11F1, el método fue someter a las muestras a vacío a 75 torr durante 1 a 2 horas. El recuento de partículas se llevó a cabo antes de 2 horas después de que se completase el proceso de desgasificación.

Las figuras 30A y 30B muestran los resultados de los ensayos de HIAC para las formulaciones anteriormente identificadas incubadas en envases durante 0 semanas y cuatro meses. Se contaron partículas de 10 µm y 25 µm. Las figuras 30A y 30B demuestran que todas las formulaciones de 11F1 eran estables, como se midió con HIAC. Los recuentos de partículas para todas las formulaciones se encuentran por debajo de los límites USP para cada tamaño de partícula (10 µm y 25 µm). Los límites USP para las partículas de 10 µm es de 6000 por envase y para las partículas

de 25 µm, 600 por envase.

Ejemplo 33

Especificidad de unión de 11F1

Los resultados de este ensayo demuestran que 11F1 se une a PCSK9 y no a PCSK1, PCSK2, PCSK7 o furina, lo que demuestra la especificidad de 11F1 por PCSK9.

Se unió PCSK9 biotinilada, diluida en tampón A (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1 %, Tween al 0,05 %, pH 7,5) a placas de 96 pocillos recubiertas con neutravidina a una concentración de 0,2 µg/ml, durante una hora de incubación a temperatura ambiente. Por separado, se incubaron 0,4 µg/ml de 11F1 durante una hora a temperatura ambiente con diversas concentraciones (en el intervalo de 0 a 20 µg/ml) de PCSK1, PCSK2, PCSK7, PCSK9 o furina (R&D Systems, Minneapolis, MN) (diluido en tampón A sin tween). Se incluyó inhibidor de furina a 4,5 µg/ml con todas las reacciones que contenían furina. La placa de estreptavidina recubierta con PCSK9 se lavó con tampón A y se añadió la mezcla de anticuerpo/proproteína convertasa a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después del lavado, se detectó el anticuerpo unido mediante incubación con anticuerpo de cabra anti-Fc humana-HRP (160 ng/ml, diluido en tampón A) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) seguido de sustrato de TMB. La reacción se detuvo con HCl 1 N y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA).

Este ensayo se basó en la capacidad de la proproteína convertasa en solución para competir por la unión de 11F1 a PCSK9 capturada en la placa. La preincubación de 11F1 y PCSK9 en solución redujo de manera dependiente de la dosis y robusta la cantidad de unión de 11F1 a PCSK9 capturada en la placa, deducida mediante la DO450 (figura 31). Todos los resultados se expresaron como el valor medio de DO450 ± desviación típica frente a la concentración de la proproteína convertasa. La preincubación de 11F1 con PCSK1, PCSK2, PCSK7 o furina, en solución, no tuvo un impacto significativo en la unión de 11F1 a PCSK9 capturado en la placa. Por tanto, a las concentraciones de proteína estudiadas, 11F1 se une únicamente a PCSK9 y no a los otros miembros de la familia de proproteína convertasa ensayados.

Ejemplo 33

Eficacia de la inhibición mediante 11F1 de la unión de LDLR:PCSK9

Este ejemplo demuestra que las concentraciones nanomolares de 11F1 pueden inhibir la unión de PCSK9 tanto D374Y como de tipo silvestre al LDLR en las condiciones de este ensayo.

En resumen, re recubrieron placas transparentes de 384 pocillos con 2 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-receptor de LDLR (R&D Systems, Minneapolis, MN), diluido en PBS, mediante incubación durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron exhaustivamente con tampón A (cacodilato de sodio 100 mM, pH 7,5) y después se bloquearon con tampón B (leche deshidratada desgrasada al 1 % [Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA] en tampón A) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubaron las placas con 0,4 µg/ml de receptor de LDL (R&D Systems, Minneapolis, MN) diluido en tampón C (tampón B suplementado con CaCl2 10 mM) durante 1,5 horas a temperatura ambiente. De manera concurrente con esta incubación, se incubaron 20 ng/ml de PCSK9 D374Y biotinilada o 100 ng/ml de PCSK9 TS biotinilada con diversas concentraciones del anticuerpo anti-PCSK9 11F1 diluido en tampón A (concentraciones finales en el intervalo de 6,0 ng/ml a 200 ug/ml para el ensayo de PCSK9 D374Y o de 3,1 ng/ml a 25 ug/ml para el ensayo de PCSK9 TS). Se lavaron las placas recubiertas con LDLR y se añadió la mezcla de PCSK9 biotinilada/anticuerpo. La placa de LDLR se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se detectó la unión de PCSK9 biotinilada al LDLR mediante incubación con estreptavidina-HRP (500 ng/ml en tampón C), seguido de sustrato de TMB. La reacción se detuvo con HCl 1 N y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Se usó el programa informático GraphPad Prism (v 4.01) para representar el log de la concentración de anticuerpo frente a la DO450 para determinar los valores de CI50 mediante regresión no lineal.

11F1 inhibió la unión de LDLR:PCSK9. Los valores de CI50 para 11F1 en el ensayo de PCSK9 D374Y variaron de 7,3 nM a 10,1 nM, con una media (± DT) de 9,1 nM ± 1,5 nM (n=3). Los valores de CI50 para 11F1 en el ensayo de PCSK9 de tipo silvestre variaron de 4,4 nM a 8,1 nM, con una media (± DT) de 5,9 nM ± 1,9 nM (n=3). Cabe destacar que estos valores de CI50 dependen de la cantidad de PCSK9 D374Y o de PCSK9 TS usada en el ensayo de unión. Se representa en la figura 32 y la figura 33 una curva de respuesta a la dosis representativa para los ensayos tanto de D374Y como de tipo silvestre, respectivamente.

Ejemplo 34

Eficacia de 11F1 en el bloqueo de la captación celular de LDL

11F1 bloquea la interacción entre PCSK9 y LDLR *in vitro* y puede prevenir la reducción mediada por PCSK9 de la

captación de LDL en células HepG2.

En resumen, se sembraron células HepG2 humanas en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente (Fisher Scientific CO LLC, Santa Clara, CA) a una densidad de $5x10^4$ células por pocillo en DMEM (Mediatech Inc., Herndon, VA) suplementado con FBS al 10 % y un 1 % de solución de antibiótico-antimicótico (Mediatech Inc., Herndon, VA). Las células se incubaron a 37 °C (CO2 al 5 %) durante una noche. Para formar el complejo entre PCSK9 D374Y y el anticuerpo o entre PCSK9 TS y el anticuerpo, se prepararon diluciones seriadas (1:2) de 11F1 de 666,7 nM a 0,7 nM (para bloquear PCSK9 D374Y) o de 3,3 µM a 3,3 nM (para bloquear PCSK9 TS), en tampón de formulación (HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,15 M). Se diluyeron PCSK9 D374Y (2 µg/ml) o PCSK9 TS (25 µg/ml) en tampón de captación (DMEM que contenía FBS al 1 %) y se incubaron con las diversas concentraciones de 11F1 o tampón de captación solo (control negativo) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se diluyó BODIPY-LDL (Invitrogen, Carlsbad, CA) en tampón de captación a una concentración de 12 µg/ml. Después de incubar durante una noche, se enjuagaron las células HepG2 dos veces con DPBS (Mediatech Inc., Herndon, VA). Se añadieron a las células veinticinco microlitros de PCSK9 D374Y o PCSK9 TS en complejo con 11F1 y 25 µl de BODIPY-LDL diluido (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron a 37 °C (CO2 al 5 %) durante 3 horas. Las células se lavaron con DPBS 5 veces y se resuspendieron en 100 µl de DPBS. Las señales fluorescentes se detectaron usando un lector de placas Safire (Tecan Systems Inc., San Jose, CA) a 480-520 nm (excitación) y 520-600 nm (emisión) y se expresaron como unidades de fluorescencia relativa (UFR).

Se usó el programa informático GraphPad Prism (versión 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) para representar el log de la concentración de anticuerpo frente a las UFR y para determinar los valores de CE50 mediante regresión no lineal usando el programa de ajuste de curvas de respuesta a la dosis sigmoidal (pendiente variable).

Este ejemplo demuestra que 11F1 bloqueó la reducción mediada por PCSK9 D374Y o PCSK9 TS de la captación de LDL en células HepG2 de una manera dependiente de la dosis. La adición de PCSK9 D374Y purificada recombinante (2 µg/ml) o PCSK9 TS (25 µg/ml) a células HepG2 redujo la captación de BODIPY-LDL de un -50 a un 60 % y un -40 % del nivel medido en células no tratadas, respectivamente. Los anticuerpos restauraron de una manera dependiente de la dosis la captación de LDL hasta el nivel observado en células no tratadas. El valor medio (± SD) de CE50 para la capacidad de 11F1 de bloquear la reducción mediada por PCSK9 D374Y de la captación de LDL fue de 35,3 ± 9,1 nM (n = 6, figura 34). El valor de CE50 para la capacidad de 11F1 de bloquear la reducción mediada por PCSK9 TS de la captación de LDL fue de 124,2 ± 28,5 nM (n = 3, figura 35). Cabe destacar que estos valores de CE50 son una función de la cantidad de PCSK9 D374Y recombinante o de PCSK9 TS usada en el ensayo celular. El valor de CE50 es menor frente a PCSK9 D374Y que frente a PCSK9 TS ya que se usó una menor cantidad de PCSK9 D374Y en el ensayo debido a que su afinidad de unión al LDLR es de 5 a 30 veces mayor que la de PCSK9 TS (Cunningham et al., 2007; Fisher et al, 2007; Kwon et al, 2008).

Los valores de CE50 comunicados en el presente documento son representativos para los valores medios obtenidos de 3 a 6 mediciones separadas para 11F1.

Ejemplo 35

Eficacia de 11F1 y 8A3 en el bloqueo de PCSK9 humana expresada mediante un virus adenoasociado en un modelo de ratón

Una sola administración embolada intravenosa de los anticuerpos anti-PCSK9 11F1 u 8A3 da lugar a una reducción significativa en el no-HDL-C y los TC séricos en ratones que expresan PCSK9 humana por medio de un AAV. Este ejemplo demuestra la eficacia de ambos anticuerpos anti-PCSK9 en el bloqueo de la función de PCSK9 humana *in vivo*.

En resumen, se generaron 120 ratones C57BL/6 que expresaban PCSK9 humana mediante infección con un virus adenoasociado (AAV) modificado por ingeniería genética que codificaba PCSK9 humana, dando como resultado niveles elevados de colesterol asociado a lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en circulación. El análisis de colesterol sérico se llevó a cabo usando el analizador químico Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento con niveles similares de no-HDL-C (LDL-C y VLDL-C), HDL-C y TC. En el día 0 de tratamiento (T=0), se sacrificó a un subconjunto de ratones y se recogió el suero para establecer los niveles basales de ese día. Posteriormente, se administró a los ratones restantes 11F1, 8A3 o anticuerpo de control IgG2 anti-hemocianina de lapa californiana (KLH) a 30 mg/kg mediante inyección en la vena caudal. En los días 1 a 5 después de la inyección, se sacrificó a subconjuntos de ratones y se recogió la sangre completa de la vena cava y se dejó coagular durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 12.000 rpm con una centrifugadora de sobremesa durante 10 minutos, se recogió suero. El análisis de colesterol sérico se llevó a cabo usando el analizador químico Cobas Integra 400 plus.

Se determinaron las concentraciones séricas de PCSK9 usando un ensayo ELISA sándwich. Se recubrieron placas transparentes de 96 pocillos durante una noche con 2 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 (31H4) diluido en 1X PBS. Las placas se lavaron exhaustivamente con 1X PBS/Tween al 0,05 % y después se bloquearon durante 2 horas con BSA al 3 %/1XPBS. Después del lavado, las placas se incubaron durante 2 horas con suero diluido en

diluyentes de ensayo generales (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN). Se ensayó PCSK9 humana recombinante (de 1 ng/ml a 500 ng/ml) de manera concurrente y se usó para generar una curva patrón en cada placa de ELISA. Se añadió un anticuerpo policlonal biotinilado de conejo anti-PCSK9 (D8773, Amgen Inc, CA) a 1 ug/ml (en BSA al 1 %/PBS), seguido de neutravidina-HRP a 200 ng/ml (en BSA al 1 %/PBS). La PCSK9 unida se detectó mediante incubación con sustrato TMB. La reacción se detuvo mediante la adición de HCL 1N y la absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Se usó la curva patrón (ajuste logístico de 4 parámetros) generada con PCSK9 humana recombinante para determinar la concentración correspondiente de PCSK9 en las muestras de suero.

Se determinaron las concentraciones séricas de anticuerpo usando un ensayo ELISA sándwich. Como anticuerpo de captura y anticuerpo de detección se usaron anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humana marcado con HRP y anticuerpo policlonal anti-Fcγ de IgG humana (ambos de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), respectivamente. Una solución de sustrato de 3,3',5,5'tetrametilbencidina (TMB) reaccionó con el peróxido y en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP), creó una señal colorimétrica que era proporcional a la cantidad del respectivo anticuerpo anti-PCSK9 unido al reactivo de captura. Esta intensidad del color (densidad óptica, DO) se midió a 450 nm - 650 nm usando un lector de microplacas (Spectra Max Plus 384). Los datos se analizaron usando el paquete de reducción de datos Watson versión 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, MA) con una regresión logística (autoestimada) de curvas patrón preparadas por separado. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el ensayo fue de ng/ml. 34,4.

Cálculo de parámetros farmacocinéticos en ratones AAV

Se llevó a cabo un análisis no compartimental (NCA) en las concentraciones séricas usando los puntos de tiempo nominales predeterminados para cada sujeto usando WinNonlin Enterprise, versión 5.1.1 (Pharsight, St. Louis, MO). Los puntos de datos para estimar las constantes de velocidad de eliminación terminal y las semividas se seleccionaron mediante inspección visual de los perfiles de concentración-tiempo. Los parámetros de NCA comunicados incluyen: semivida aparente (t1/2), área bajo la curva de concentración sérica-tiempo desde tiempo cero hasta la última concentración medida (ABC0-t) y la eliminación sérica aparente (CL0-t). La ABC0-t se determinó usando el método log lineal-trapezoidal lineal y la CL0-t se calculó mediante la dosis/ABC0-t para los anticuerpos 11F1, 8A3 y 31H4. El análisis en solución después de la dosis de estudio mostró que las dosis reales eran un 20 % del objetivo de 30 mg/kg. Sin embargo, para el control de IgG2, el análisis mostró que la dosis real era únicamente un 40 % del objetivo previsto. Por tanto, se usó una dosis corregida de 12 mg/kg para calcular la CL0-t para el control de IgG2. Los parámetros se comunicaron con hasta tres cifras significativas, excepto para la semivida, que se comunicó con dos cifras significativas.

Análisis estadístico

Todos los resultados del colesterol se expresaron como la media ± error estándar de la media. Todos los datos farmacocinéticos se expresaron como la media ± desviación típica. El valor de p de 0,05, determinado mediante ANOVA de 1 vía, se usó como el umbral para determinar la significación estadística entre los animales a los que se inyectó el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH y aquellos a los que se administró el anticuerpo anti-PCSK9 en el mismo punto de tiempo.

Efecto de los anticuerpos anti-PCSK9 en el no-HDL-C, HDL-C y TC séricos

Para establecer un valor basal, se sacrificó a un subconjunto de ratones que expresaban PCSK9 humana antes de la inyección de anticuerpos y se recogió la sangre. Los niveles de no-HDL-C, HDL-C y TC en estos animales fueron de 33 ± 4, 117 ± 4 y 183 ± 9 mg/dl, respectivamente (media ± EEM). Se determinó que los niveles de PCSK9 en los animales no sometidos a experimentación eran de 4921 ng/ml ± 2044 ng/ml.

En comparación con los ratones a los que se inyectó el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH (animales de control), la inyección de 11F1 produjo una reducción significativa del no-HDL-C en los días 1, 2 y 4 después de la inyección (con un máximo del 59 %), mientras que el TC se redujo significativamente únicamente en el día 4 (en un 22 %) (figura 36, figura 37). No se observó una reducción significativa del HDL-C en ningún punto de tiempo (figura 38).

En comparación con los animales de control, la inyección de 8A3 produjo una reducción significativa del no-HDL-C en los días 1, 2 y 4 después de la inyección (con un máximo del 65 %), aunque el TC se redujo significativamente en el día 2 después de la inyección (con un máximo del 24 %) (figura 36, figura 37). No se observó una reducción significativa del HDL-C en ningún punto de tiempo (figura 38).

Farmacocinética

Con una dosis intravenosa de 30 mg/kg, 11F1 y 8A3 tuvieron un comportamiento farmacocinético muy similar (figura 39). Para estas dos moléculas, las exposiciones de ABC0-t, la CL0-t estimada y las semividas aparentes fueron equivalentes (tabla de la figura 40). El anticuerpo de control IgG2 anti-KLH tuvo una exposición de ABC0-t inesperadamente menor que 11F1 y 8A3, pero esto se debe probablemente a que el anticuerpo se administra a una

dosis menor de la prevista (12 mg/kg en comparación con 30 mg/kg; el análisis de la dosis en solución mostró que la concentración de anticuerpo era un 40 % del objetivo. La CL0-t del anticuerpo de control IgG2 anti-KLH fue similar a la de 11F1 y 8A3, cuando se calculó usando la dosis corregida y se estimó que la semivida aparente del anticuerpo de control IgG2 anti-KLH era de > 120 horas. Estos datos sugieren que los efectos del ligando de PCSK9 en la disposición de anticuerpo son menos pronunciados para 11F1 y 8A3 cuando se comparan con otros anticuerpos administrados en el modelo AAV, debido a que los valores de CL0-t de 11F1 y 8A3 son más similares al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH.

Sumario.

La expresión de PCSK9 humana mediante AAV en ratones (aproximadamente 5 ug/ml) dio como resultado un nivel sérico de no-HDL-C de aproximadamente 33 mg/dl. Después de una inyección de 30 mg/kg de 11F1, se observó una reducción sérica significativa de no-HDL-C en los días 1, 2 y 4 después de la inyección (con un máximo del 59 % en comparación con los anticuerpos de control). Se observó una reducción significativa del TC únicamente en el día 4. La inyección de 8A3 dio como resultado un patrón similar de reducción de no-HDL-C, con un máximo del 65 % en comparación con los animales de control. Sin embargo, la administración de 8A3 dio como resultado una reducción significativa del TC únicamente en el día 2, después de la inyección, con un máximo del 24 %. No se observó una reducción significativa del HDL-C en animales a los que se administró 11F1 u 8A3. El análisis de los niveles séricos de anticuerpo de 11F1 y 8A3 demostró un perfil similar al del anticuerpo de control IgG2 anti-KLH.

Ejemplo 36

Efecto de una sola dosis subcutánea de 11F1, 21B12 y 8A3 en los lípidos séricos en monos cinomolgos

Una sola administración SC de 11F1, 8A3 o 21B12 a monos cinomolgos ocasiona una reducción significativa del LDL-C sérico y del TC. Este estudio demostró la capacidad de los anticuerpos anti-PCSK9 para reducir el colesterol sérico en primates no humanos.

En resumen, se aclimató a monos cinomolgos no sometidos a experimentación a su ambiente durante al menos 2 semanas antes de la experimentación. Los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento basándose en una detección sistemática previa de sus niveles séricos de TC, HDL-C, LDL-C y triglicéridos y su peso corporal. Después de 1 semana, se privó de alimento a los animales durante una noche y se extrajo sangre de la vasculatura periférica (vena cefálica o safena), para medir los niveles de lípidos séricos basales en un punto de tiempo denominado T = 0. Después, se inyectó por vía SC a los ratones o bien el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH, 11F1, 21B12 u 8A3 (todos en NaOAc 10 mM a pH 5,2, sacarosa al 9 %) a 0,5 mg/kg (todos a 0,4 ml/kg de peso corporal). Después, se recogieron muestras de sangre en ayunas de los animales en los puntos de tiempo indicados a lo largo de un periodo de 45 días.

Diseño experimental

N.º de grupo	n.º de machos	Vía	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc. (mg/ ml)	Volumen (ml/kg)
1	5	SC	Anti-KLH	0,5	1,09	0,4
2	5	SC	21B12	0,5	1,19	0,4
3	5	SC	11F1	0,5	1,11	0,4
4	5	SC	8A3	0,5	1,25	0,4

En los puntos de tiempo especificados, se recogió sangre de los animales en condiciones de ayuno durante una noche de la vasculatura periférica (vena cefálica o safena). Se dejó coagular la sangre completa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 3.000 rpm durante 20 minutos, se recogió suero. Se llevó a cabo un análisis directo del colesterol sérico usando el analizador Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics Inc, Indianápolis, IN). Los niveles de apolipoproteína B se determinaron en los puntos de tiempo especificados (día 0, 3, 6, 15, 24 y 33) por Anilytics, MD, con la siguiente metodología. Se usó una alícuota de 17 µl de la muestra (sin preparación) para su análisis con un analizador Hitachi 717 usando una curva patrón de 6 puntos. En caso de que el valor inicial de la muestra fuese mayor que la linealidad de la curva patrón, se diluyó la muestra y se repitió, multiplicando el resultado por el factor de dilución adecuado. Los reactivos para el ensayo (kit de reactivo de APO-B n.º 86071, conjunto de anticuerpos n.º 86060, conjunto de control n.º 86103) se obtuvieron de DiaSorin (Stillwater, MN).

Las concentraciones de anticuerpo en suero se determinaron usando un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) con un intervalo de ensayo de 34,4 a 3000 ng/ml (siendo 34,4 ng/ml el límite inferior de cuantificación [LLOQ]).

Se llevó a cabo un análisis no compartimental (NCA) en las concentraciones séricas usando los puntos de tiempo nominales predeterminados para cada sujeto usando Watson® LIMS, versión 7.0.0.01 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Los puntos de datos para estimar las constantes de velocidad de eliminación terminal y las semividas se seleccionaron mediante inspección visual de los perfiles de concentración-tiempo y el mejor ajuste lineal (normalmente

de 360 h hasta que las concentraciones de anticuerpo cayeron por debajo del límite inferior de cuantificación). Los parámetros de NCA comunicados incluyen: semivida terminal (t1/2,z), la concentración sérica máxima (Cmáx), el área bajo la curva de concentración sérica-tiempo desde el tiempo cero hasta el infinito (ABC0-inf) y la eliminación sérica aparente (CL/F). La ABC0-inf se calculó usando el método log lineal-trapezoidal lineal. Todos los parámetros se comunicaron con tres cifras significativas, excepto para la semivida, que se comunicó con dos cifras significativas.

Análisis estadístico

Un modelo estadístico que considera el valor basal como covariable y el grupo de tratamiento como un efecto fijo es adecuado para la respuesta transformada logarítmicamente en cada punto de tiempo para LDL-C, HDL-C, TC y triglicéridos. Se aplicó corrección de comparación múltiple de Tukey para ajustar las comparaciones por pares en cada punto de tiempo. La significación estadística se evaluó en alfa=0,05 usando los valores de p ajustados.

Efecto de 11F1, 21B12 y 8A3 en el colesterol asociado a LDL sérico

La máxima reducción de LDL-C para 11F1 se observó 9 días después de la inyección, con una reducción del 57 % del LDL-C en comparación con los monos tratados con anticuerpo de control IgG2 anti-KLH (animales de control). El LDL-C volvió a niveles similares a los observados en los animales de control en el día 27. La máxima reducción de LDL-C para 21B12 se observó 3 días después de la inyección, con una reducción del 64 % del LDL-C en comparación con los animales de control. El LDL-C volvió a niveles similares a los animales de control en el día 6. La máxima reducción de LDL-C para 8A3 se observó 4 días después de la inyección, con una reducción del 54 % del LDL-C en comparación con los animales de control. El LDL-C volvió a niveles similares a los observados en los animales de control en el día 27 (figura 41).

Efecto de 11F1, 21B12 y 8A3 en el colesterol total sérico

La máxima reducción de TC para 11F1 se observó 9 días después de la inyección, con una reducción del 27 % del TC en comparación con los monos tratados con anticuerpo de control IgG2 anti-KLH (animales de control). El TC volvió a niveles similares a los observados en los animales de control en el día 27. La máxima reducción de TC para 21B12 se observó 3 días después de la inyección, con una reducción del 20 % del TC en comparación con los animales de control. El TC volvió de manera transitoria a niveles similares a los observados en los monos tratados con vehículo en el día 4, pero fue significativamente más bajo entre los días 14 y 18, inclusive. La máxima reducción de TC para 8A3 se observó 9 días después de la inyección, con una reducción del 22 % del TC en comparación con los animales de control. El TC volvió a niveles similares a los observados en los animales de control en el día 30 (figura 42).

Efecto de 11F1, 21B12 y 8A3 en el colesterol asociado a HDL sérico y los triglicéridos

De media y en cada punto de tiempo, los niveles de HDL-C o de triglicéridos para los animales tratados con 11F1 u 8A3 no fueron significativamente diferentes (basándose en un nivel de significación alfa = 0,05) respecto de los observados en los monos tratados con anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. Sin embargo, 21B12 indujo un cambio estadísticamente significativo en el HDL-C en un solo punto de tiempo (día 18 después de la inyección) (figura 43 y figura 45).

Efecto de 11F1, 21B12 y 8A3 en la apolipoproteína B (ApoB)

Se midieron los niveles de ApoB en los días 3, 6, 15, 24 y 33, después de la inyección. 11F1 y 8A3 se asociaron con reducción de ApoB en los días 3 a 24, en comparación con los monos tratados con anticuerpo de control IgG2 anti-KLH (figura 46). 21B12 se asoció con menores niveles estadísticamente significativos de ApoB únicamente en el día 3.

Perfiles farmacocinéticos de 11F1, 21B12 y 8A3

En 748 se muestra una gráfica de resumen de los perfiles de concentración-media tiempo según el tratamiento. Los parámetros farmacocinéticos medios estimados para los animales que recibieron 11F1, 21B12, 8A3 y anticuerpo de control IgG2 anti-KLH se presentan en la tabla de la figura 47.

La absorción de anticuerpo en todos los grupos fue consistente y característica de la administración subcutánea de anticuerpo. EL comportamiento farmacocinético de 21B12 con respecto a CL/F, Cmáx y ABC0-inf fue coherente con lo observado en estudios anteriores, donde se administró 21B12 en la misma dosis. Las farmacocinéticas de 11F1 y 8A3 difirieron significativamente respecto de 21B12, donde se observó una menor CL/F (aproximadamente un 15 % de la CL/F de 21B12) y se estimaron semividas más largas (aproximadamente 200 h en comparación con 40 h para 21B12).

De manera destacable, las farmacocinéticas de 11F1 y 8A3 fueron indistinguibles entre sí y respecto del anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. Estos datos sugieren que la disposición de 11F1 y 8A3 se ve afectada en mucha menor medida por la asociación con la diana de PCSK9 que 21B12, dado que 11F1 y 8A3 tienen el mismo perfil de exposición

que el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH sin afinidad por PCSK9.

Sumario de Resultados

A lo largo de los 45 días de estudio, se observó una reducción estadísticamente significativa del TC y LDL-C en animales a los que se administró 11F1, 21B12 u 8A3, en comparación con el anticuerpo de control IgG2 anti-KLH. 11F1 se asoció con una reducción del LDL-C estadísticamente significativa (frente al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH) desde el día 2 hasta el día 24, inclusive. 21B12 demostró una reducción del LDL-C estadísticamente significativa (frente al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH) desde el día 1 hasta el día 4, inclusive. 8A3 demostró una reducción del LDL-C estadísticamente significativa (frente al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH) desde el día 1 hasta el día 24, inclusive. Los cambios en el TC y la ApoB reflejaron los cambios observados en el LDL-C para todos los grupos. 11F1 logró una reducción máxima del LDL-C (frente al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH en el mismo punto de tiempo) 9 días después de la inyección (-57 %). 21B12 logró una reducción máxima del LDL-C (frente al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH en el mismo punto de tiempo) 3 días después de la inyección (-64 %). 8A3 logró una reducción máxima del LDL-C (frente al anticuerpo de control IgG2 anti-KLH en el mismo punto de tiempo) 4 días después de la inyección (-54 %). 21B12 redujo el HDL-C en un solo punto de tiempo, 18 días después de la inyección. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de HDL-C después de la administración de 11F1 u 8A3. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de triglicéridos después de la administración de 11F1, 21B12 u 8A3.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación estable que comprende
un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a PCSK9, en donde PCSK9 comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el anticuerpo monoclonal en una cantidad de 100 mg/ml a 150 mg/ml y
un tampón farmacéuticamente aceptable en una cantidad de 0,05 mM a 40 mM, en donde el tampón farmacéuticamente aceptable es un tampón de acetato de sodio y
un tensioactivo farmacéuticamente aceptable en una cantidad que es del 0,004 % p/v al 0,01 % p/v, en donde el tensioactivo farmacéuticamente aceptable es polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40 o polisorbato 20 y
al menos un estabilizante farmacéuticamente aceptable del 0,5 % p/v al 10 % p/v,
en donde la formulación estable tiene un pH de entre 4,0 a 6,0,
en donde dicho estabilizante farmacéuticamente aceptable es prolina y
en donde el anticuerpo monoclonal comprende
una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 o una variante de la misma, en donde la variante comprende una inserción, eliminación y/o sustitución de aminoácidos en relación con la SEQ ID NO: 23; y
una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 o una variante de la misma, en donde la variante comprende una inserción, eliminación y/o sustitución de aminoácidos en relación con la SEQ ID NO: 49 y
una región constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 156 y una región constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155.

2. La formulación estable de la reivindicación 1, en donde el tampón farmacéuticamente aceptable está presente en una cantidad de 10-20 mM.

3. La formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho tensioactivo farmacéuticamente aceptable es polisorbato 80 o polisorbato 20.

4. La formulación estable de la reivindicación 1, en donde la prolina está presente en una cantidad de entre el 2 % y el 3 % p/v.

5. La formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la formulación

a) tiene un pH de entre 5,0 a 5,5;
b) comprende una viscosidad de 30 cP o menos a 25 °C;
c) comprende una viscosidad de 12 cP o menos a 25 °C; y/o
d) comprende una osmolalidad entre 250 mOsmol/kg a 350 mOsmol/kg.

6. La formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la formulación estable permanece estable durante al menos 3, 6, 12 o 24 meses.

7. La formulación estable de la reivindicación 1 que comprende:

(a) un anticuerpo monoclonal en una cantidad de 100 mg/ml a 150 mg/ml, comprendiendo dicho anticuerpo monoclonal:

una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 o una variante de la misma, en donde la variante comprende una inserción, eliminación y/o sustitución de aminoácidos en relación con la SEQ ID NO: 23; y
una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 o una variante de la misma, en donde la variante comprende una inserción, eliminación y/o sustitución de aminoácidos en relación con la SEQ ID NO: 49; y
una región constante de cadena ligera de SEQ ID NO: 156; y
una región constante de cadena pesada de SEQ ID NO: 154 o SEQ ID NO: 155

(b) acetato de sodio 10-20 mM;
(c) entre un 2,0 % a un 3,0 % p/v de prolina;
(d) un 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80; y
(e) un pH de 5,0 a 5,5.

8. La formulación estable de la reivindicación 7 que comprende:

(b) acetato de sodio 10 mM;
(c) entre un 2,0 % a un 3,0 % p/v de prolina;
(d) un 0,01 % p/v de polisorbato 20 o polisorbato 80; y
(e) un pH de 5,0.

9. La formulación estable de la reivindicación 8, que comprende:

(a) 120 mg/ml; o
(b) 140 mg/ml;
de dicho anticuerpo monoclonal.

10. La formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno relacionado con el colesterol en un paciente.

11. La formulación estable para el uso de la reivindicación 10, en donde el trastorno relacionado con el colesterol se selecciona entre el grupo que consiste en hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia no familiar, lipoproteína (a) elevada, cardiopatía, síndrome metabólico, diabetes, cardiopatía coronaria, ictus, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, arteriopatía periférica, hiperlipidemia y dislipidemia.

12. La formulación estable para el uso de la reivindicación 11, en donde la hipercolesterolemia familiar incluye hipercolesterolemia familiar heterocigótica e hipercolesterolemia familiar homocigótica.

13. La formulación estable para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende administrar al paciente una dosis de:

(a) hasta 140 mg de dicho anticuerpo una vez cada dos semanas (Q2W);
(b) hasta 420 mg de dicho anticuerpo una vez cada dos semanas (Q2W); o
(c) hasta 420 mg de dicho anticuerpo una vez cada cuatro semanas (Q4W).

QEDEDGDYEELVLALRSEEDGLAEAPEHGTTATFHRCAKDPWRLPGTYVVVLKEETHL
SQSERTARRLQAQAARRGYLTKILHVFHGLLPGFLVKMSGDLLELALKLPHVDYIEEDS
SVFAQSIPWNLERITPPRYRADEYQPPDGGSLVEVYLLDTSIQSDHREIEGRVMVTDFEN
VPEEDGTRFHRQASKCDSHGTHLAGVVSGRDAGVAKGASMRSLRVLNCQGKGTVSGT
LIGLEFIRKSQLVQPVGPLVVLLPLAGGYSRVLNAACQRLARAGVVLVTAAGNFRDDAC
LYSPASAPEVITVGATNAQDQPVTLGTLGTNFGRCVDLFAPGEDIIGASSDCSTCFVSQS
GTSQAAAHVAGIAAMMLSAEPELTLAELRQRLIHFSAKDVINEAWFPEDQRVLTPNLVA
ALPPSTHGAGWQLFCRTVWSAHSGPTRMATAIARCAPDEELLSCSSFSRSGKRRGERME
AQGGKLVCRAHNAFGGEGVYAIARCCLLPQANCSVHTAPPAEASMGTRVHCHQQGHV
LTGCSSHWEVEDLGTHKPPVLRPRGQPNQCVGHREASIHASCCHAPGLECKVKEHGIPA
PQGQVTVACEEGWTLTGCSALPGTSHVLGAYAVDNTCVVRSRDVSTTGSTSEEAVTAV
AICCRSRHLAQASQELQ

SEQ ID NO:1

FIG. 1A

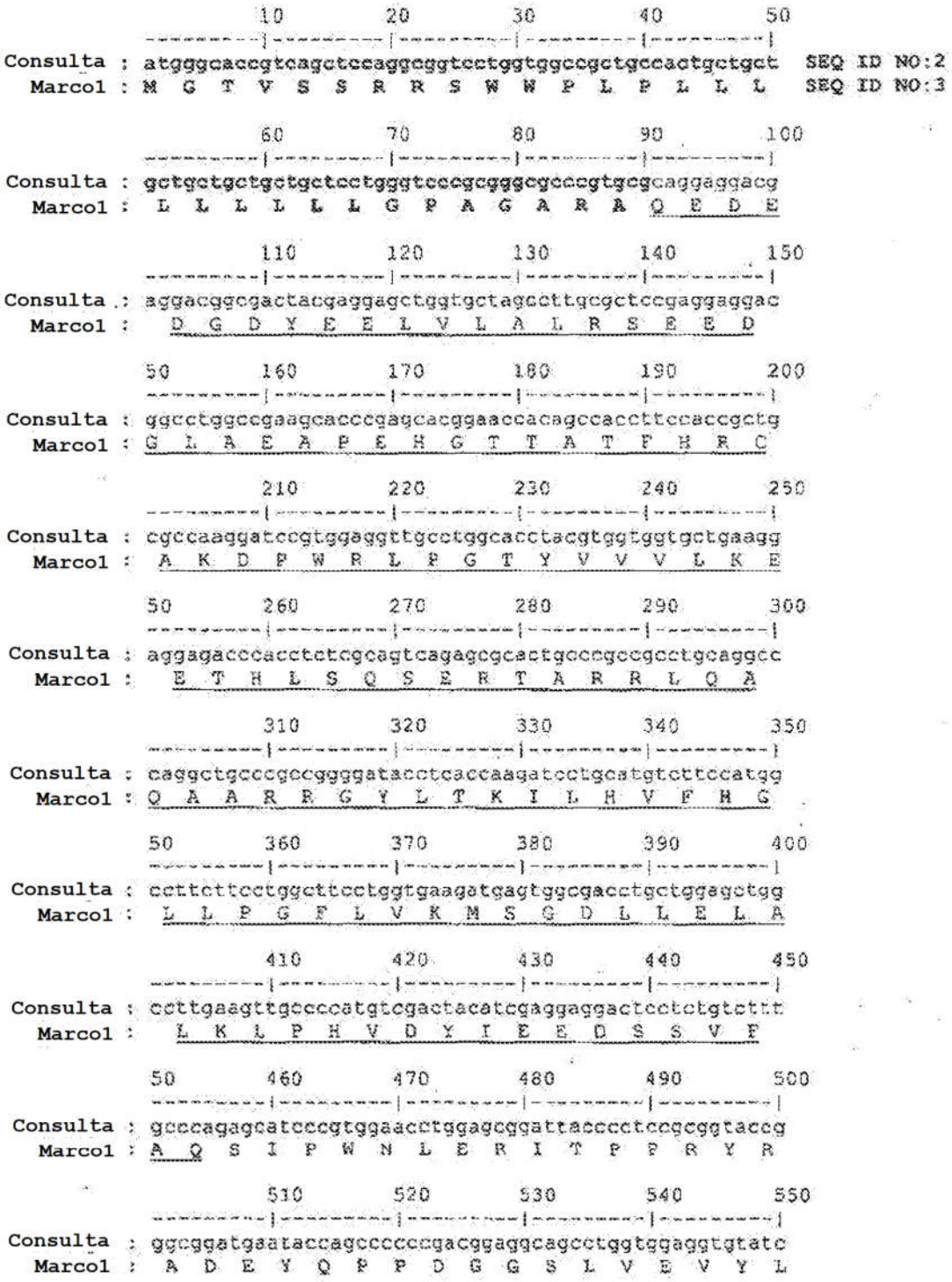

10 20 30 40 50
Consulta : atgggcaccgtcagctccaggcggtcctggtggccgctgccactgctgct SEQ ID NO:2
Marco1 : M G T V S S R R S W W P L P L L L SEQ ID NO:3
60 70 80 90 100
Consulta : gctgctgctgctgctcctgggtcccgcgggcgcccgtgcgcaggaggacg
Marco1 : L L L L L L G P A G A R A Q E D E
110 120 130 140 150
Consulta : aggacggcgactacgaggagctggtgctagccttgcgctccgaggaggac
Marco1 : D G D Y E E L V L A L R S E E D
50 160 170 180 190 200
Consulta : ggcctggccgaagcacccgagcacggaaccacagccaccttccaccgctg
Marco1 : G L A E A P E H G T T A T F H R C
210 220 230 240 250
Consulta : cgccaaggatccgtggaggttgcctggcacctacgtggtggtgctgaagg
Marco1 : A K D P W R L P G T Y V V V L K E
50 260 270 280 290 300
Consulta : aggagacccacctctcgcagtcagagcgcactgcccgccgcctgcaggcc
Marco1 : E T H L S Q S E R T A R R L Q A
310 320 330 340 350
Consulta : caggctgcccgccggggatacctcaccaagatcctgcatgtcttccatgg
Marco1 : Q A A R R G Y L T K I L H V F H G
50 360 370 380 390 400
Consulta : ccttcttcctggcttcctggtgaagatgagtggcgacctgctggagctgg
Marco1 : L L P G F L V K M S G D L L E L A
410 420 430 440 450
Consulta : ccttgaagttgccccatgtcgactacatcgaggaggactcctctgtcttt
Marco1 : L K L P H V D Y I E E D S S V F
50 460 470 480 490 500
Consulta : gcccagagcatcccgtggaacctggagcggattacccctccgcggtaccg
Marco1 : A Q S I P W N L E R I T P P R Y R
510 520 530 540 550
Consulta : ggcggatgaataccagcccccgacggaggcagcctggtggaggtgtatc
Marco1 : A D E Y Q P P D G G S L V E V Y L

FIG. 1B$_1$

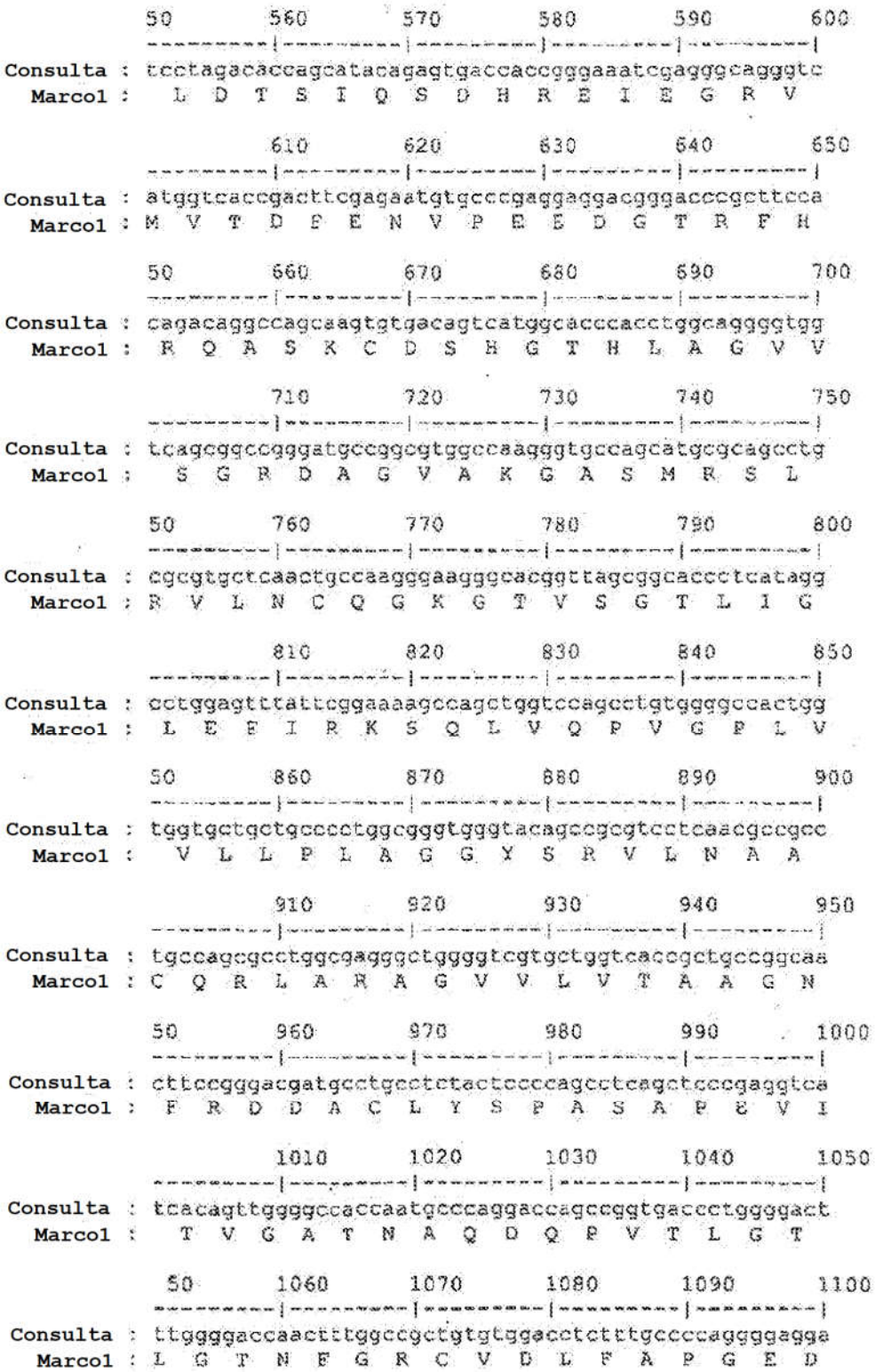

50 560 570 580 590 600
Consulta : tcctagacaccagcatacagagtgaccaccgggaaatcgagggcagggtc
Marco1 : L D T S I Q S D H R E I E G R V
610 620 630 640 650
Consulta : atggtcaccgacttcgagaatgtgcccgaggaggacgggacccgcttcca
Marco1 : M V T D F E N V P E E D G T R F H
50 660 670 680 690 700
Consulta : cagacaggccagcaagtgtgacagtcatggcacccacctggcaggggtgg
Marco1 : R Q A S K C D S H G T H L A G V V
710 720 730 740 750
Consulta : tcagcggccgggatgccggcgtggccaagggtgccagcatgcgcagcctg
Marco1 : S G R D A G V A K G A S M R S L
50 760 770 780 790 800
Consulta : cgcgtgctcaactgccaagggaagggcacggttagcggcaccctcatagg
Marco1 : R V L N C Q G K G T V S G T L I G
810 820 830 840 850
Consulta : cctggagtttattcggaaaagccagctggtccagcctgtggggccactgg
Marco1 : L E F I R K S Q L V Q P V G P L V
50 860 870 880 890 900
Consulta : tggtgctgctgccccctggcgggtgggtacagccgcgtcctcaacgccgcc
Marco1 : V L L P L A G G Y S R V L N A A
910 920 930 940 950
Consulta : tgccagcgcctggcgagggctggggtcgtgctggtcaccgctgccggcaa
Marco1 : C Q R L A R A G V V L V T A A G N
50 960 970 980 990 1000
Consulta : cttccgggacgatgcctgcctctactccccagcctcagctcccgaggtca
Marco1 : F R D D A C L Y S P A S A P E V I
1010 1020 1030 1040 1050
Consulta : tcacagttggggccaccaatgcccaggaccagccggtgaccctggggact
Marco1 : T V G A T N A Q D Q P V T L G T
50 1060 1070 1080 1090 1100
Consulta : ttggggaccaactttggccgctgtgtggacctctttgccccaggggagga
Marco1 : L G T N F G R C V D L F A P G E D

FIG. $1B_2$

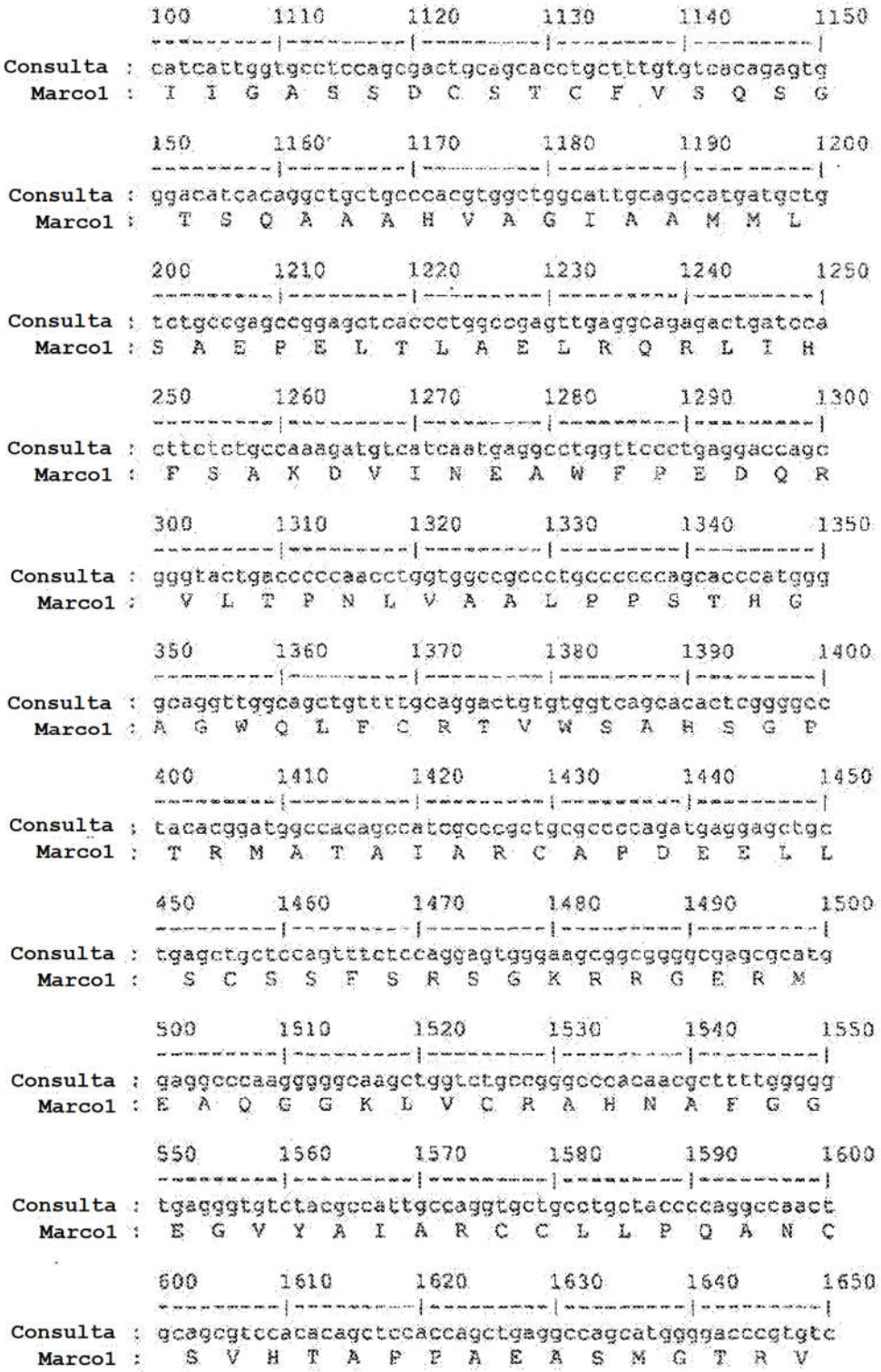

100 1110 1120 1130 1140 1150
Consulta : catcattggtgcctccagcgactgcagcacctgctttgtgtcacagagtg
Marco1 : I I G A S S D C S T C F V S Q S G
150 1160 1170 1180 1190 1200
Consulta : ggacatcacaggctgctgcccacgtggctggcattgcagccatgatgctg
Marco1 : T S Q A A A H V A G I A A M M L
200 1210 1220 1230 1240 1250
Consulta : tctgccgagccggagctcaccctggccgagttgaggcagagactgatcca
Marco1 : S A E P E L T L A E L R Q R L I H
250 1260 1270 1280 1290 1300
Consulta : cttctctgccaaagatgtcatcaatgaggcctggttccctgaggaccagc
Marco1 : F S A K D V I N E A W F P E D Q R
300 1310 1320 1330 1340 1350
Consulta : gggtactgacccccaacctggtggccgccctgcccccagcacccatggg
Marco1 : V L T P N L V A A L P P S T H G
350 1360 1370 1380 1390 1400
Consulta : gcaggttggcagctgttttgcaggactgtgtggtcagcacactcgggggcc
Marco1 : A G W Q L F C R T V W S A H S G P
400 1410 1420 1430 1440 1450
Consulta : tacacggatggccacagccatcgcccgctgcgccccagatgaggagctgc
Marco1 : T R M A T A I A R C A P D E E L L
450 1460 1470 1480 1490 1500
Consulta : tgagctgctccagtttctccaggagtgggaagcggcgggcgagcgcatg
Marco1 : S C S S F S R S G K R R G E R M
500 1510 1520 1530 1540 1550
Consulta : gaggcccaaggggcaagctggtctgccgggcccacaacgcttttggggg
Marco1 : E A Q G G K L V C R A H N A F G G
550 1560 1570 1580 1590 1600
Consulta : tgagggtgtctacgccattgccaggtgctgcctgctaccccaggccaact
Marco1 : E G V Y A I A R C C L L P Q A N C
600 1610 1620 1630 1640 1650
Consulta : gcagcgtccacacagctccaccagctgaggccagcatggggacccgtgtc
Marco1 : S V H T A P P A E A S M G T R V

FIG. $1B_3$

```
          650       1660       1670       1680       1690       1700
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : cactgccaccaacagggccacgtcctcacaggctgcagctcccactggga
  Marco1 : H  C  H  Q  Q  G  H  V  L  T  G  C  S  S  H  W  E

          700       1710       1720       1730       1740       1750
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : ggtggaggaccttggcacccacaagccgcctgtgctgaggccacgaggtc
  Marco1 :  V  E  D  L  G  T  H  K  P  P  V  L  R  P  R  G  Q

          750       1760       1770       1780       1790       1800
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : agcccaaccagtgcgtgggccacagggaggccagcatccacgcttcctgc
  Marco1 :    P  N  Q  C  V  G  H  R  E  A  S  I  H  A  S  C

          800       1810       1820       1830       1840       1850
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : tgccatgccccaggtctggaatgcaaagtcaaggagcatggaatcccggc
  Marco1 : C  H  A  P  G  L  E  C  K  V  K  E  H  G  I  P  A

          850       1860       1870       1880       1890       1900
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : ccctcaggggcaggtgaccgtggcctgcgaggagggctggaccctgactg
  Marco1 :  P  Q  G  Q  V  T  V  A  C  E  E  G  W  T  L  T  G

          900       1910       1920       1930       1940       1950
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : gctgcagcgccctccctgggacctcccacgtcctgggggcctacgccgta
  Marco1 :    C  S  A  L  P  G  T  S  H  V  L  G  A  Y  A  V

          950       1960       1970       1980       1990       2000
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : gacaacacgtgtgtagtcaggagccgggacgtcagcactacaggcagcac
  Marco1 : D  N  T  C  V  V  R  S  R  D  V  S  T  T  G  S  T

                    2010       2020       2030       2040       2050
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : cagcgaagaggccgtgacagccgttgccatctgctgccggagccggcacc
  Marco1 :  S  E  E  A  V  T  A  V  A  I  C  C  R  S  R  H  L

           50       2060       2070       2080       2090       2100
          ----------|----------|----------|----------|----------|
Consulta : tggcgcaggcctcccaggagctccag
  Marco1 :    A  Q  A  S  Q  E  L  Q
```

FIG. $1B_4$

Seq ID No.	LÍNEA	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
4	Línea germinal				DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC	RSSQSLLHSNGYNYLD	WYLQKPGQSPQLLIY
5	30A4	A3		JK3	----------S------P-----	----------------F-N	----------------
6	Línea germinal				DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
7	3C4	O2		JK4	----------------------	----R--N--S	--L----I--------
8	Línea germinal				DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
9	23B5	O2		JK5	--L-------------------	----------	---------V----
10	25G4	O2		JK5	----------------------	----------I---	----------Y-----
11	Línea germinal				QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC	TGSSSNIGAGYDVH	WYQQLPGTAPKLLIY
12	31H4	V1-13		JL2	----------------------	----------	----------S
13	27B2	V1-13		JL2	----------------------	----------H-----	----V----------
14	Línea germinal				QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLMIY
15	25A7	V1-4		JL2	----------------------	----------R--S---	----H---------V----
16	27H5	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----------P----------
17	26H5	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----------P----------
18	31D1	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----------P----------
19	20D10	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----Y----P----K----
20	27E7	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----------E----------
21	30B9	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----------P----------
22	19H9	V1-4		JL2	----------------------	----N----------S---	----------P----------
23	26E10	V1-4		JL2	----------------------	----------------S---	----------
23	21B12	V1-4		JL2	----------------------	----------	----------
24	17C2	V1-4		JL2	----------------------	----------A--S---	----------R----

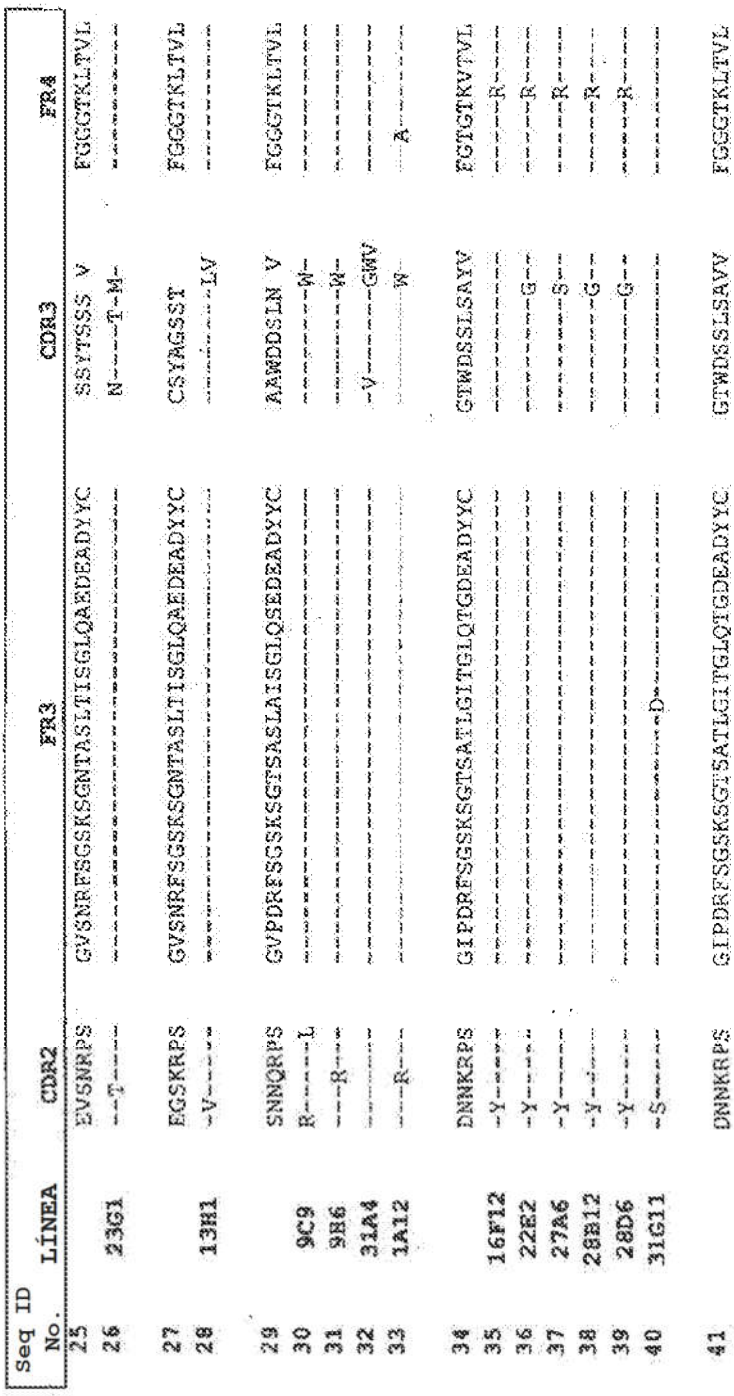
FIG. 2A

Seq ID No.	LÍNEA	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
25	Línea germinal				QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLMIY
26	23G1	V1-4		JL3	----------S--	----------	----------
27	Línea germinal				QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGSYNLVS	WYQQHPGKAPKLMIY
28	13H1	V1-7		JL3	L----------	---------N-----	----YS----------
29	Línea germinal				QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	SGSSSNIGSNTVN	WYQQLPGTAPKLLIY
30	9C9	V1-16		JL3	----------	---------K---	----V----------
31	9H6	V1-16		JL3	----------P-----------	----------	----------
32	31A4	V1-16		JL3	----------	----------	----------
33	1A12	V1-16		JL3	----------	---------K---	----E----------
34	Línea germinal				QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
35	16F12	V1-19		JL1	----------	---------E---	----------
36	22E2	V1-19		JL1	----------	---------P---	----------
37	27A6	V1-19		JL1	----------	---------E---	----Q----------
38	28B12	V1-19		JL1	----------	---------T---	----------
39	28D5	V1-19		JL1	----------T-----------	---------E---	----------
40	31G11	V1-19		JL1	----------	---------E---	----------
41	Línea germinal				QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
42	13B5	V1-19		JL2	----------	---N----------	----------
43	Línea germinal				SYELTQPPSVSVSPGQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLVIY
44	31B12	V2-1		JL2	----------R-----	----------	----------
45	Línea germinal				QPVLTQPPSASASLGASVTLTC	TLSSGYSNYKVD	WYQQRPGKGPRFVMR
46	3B6	V5-2		JL2	--------LF----------	---------S-E--	----------

FIG. 2B

FIG. 2C

Seq ID No.	LÍNEA	CDR2	FR3	CDR3	FR4
4		LGSNRAS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	MQALQTPFT	FGPGTKVDIK
5	30A4	---H---	----------E----------	--V------	----------
6		AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPLT	FGGGTKVEIK
7	3C4	-------	----------S--------	--------I	----------
8		AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPIT	FGQGTKLEIK
9	23B5	-------	----------N----------	-----S---	----------
10	25G4	--A----	----------	-----A---	----------
11		GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSLSGSV	FGGGTKLTVL
12	31H4	-------	----------	----------	----------
13	27B2	--TY---	----------	----N----V-	----------
14		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSSVV	FGGGTKLTVL
15	25A7	-------	---T----------	---------	----------
286	25A7v1	-------	---T----------	---------	----------
16	27H5	-------	---I----------F-	-----T-M-	----------
287	27H5v1	-------	---I----------F-	-----T-M-	----------
17	26H5	-------	---I----------F-	-----T-M-	----------
18	31D1	-------	----------F-	-----T-M-	-------A--
19	20D10	-------	----------F-	-----T-M-	----------
20	27E7	-------	----------F-	-----T-M-	----------
21	30B9	-------	----------F-	-----T-M-	----------
22	19H9	-------	-I----------F-	-----T-M-	----------
288	19H9v1	-------	-I----------F-	-----T-M-	----------
23	26E10	-------	----------	N----T-M-	----------
23	21B12	-------	----------	N----T-M-	----------
24	17C2	-------	----------	-----TNM-	----------



Seq ID No.	LÍNEA	CDR2	FR3	CDR3	FR4
25		EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	SSYTSSS V	FGGGTKLTVL
26	23G1	--T-----	----------------------------------	N-----T-M-	----------
27		EGSKRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC	CSYAGSST	FGGGTKLTVL
28	13H1	-V------	----------------------------------	---------LV	----------
29		SNNQRPS	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC	AAWDDSLN V	FGGGTKLTVL
30	9C9	R------L	----------------------------------	---------W-	----------
31	9B6	---R----	----------------------------------	---------W-	----------
32	31A4	----------	----------------------------------	-V--------GWV	----------
33	1A12	---R----	----------------------------------	----------W	----A-----
34		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDSSLSAYV	FGTGTKVTVL
35	16F12	-Y------	----------------------------------	----------	-----R----
36	22E2	-Y------	----------------------------------	---------G--	-----R----
37	27A6	-Y------	----------------------------------	---------S--	-----R----
38	28B12	-Y------	----------------------------------	---------G--	-----R----
39	28D6	-Y------	----------------------------------	---------G--	-----R----
40	31G11	-S------	----------D-----------------------	----------	----------
41		DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYC	GTWDSSLSAVV	FGGGTKLTVL
42	13B3	-------	----------N-----------------------	----------	----------
43		QDSKRPS	GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC	QAWDSSTAVV	FGGGTKLTVL
44	31B12	-NT-W-L	----------K-----V-----------------	---------V-	----------
45		VGTGGIVGSKGD	GIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHC	GADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTVL
46	3B6	-D---------E	----------------------------------	---------T-----	----------
45		VGTGGIV	GSKGDGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDE	SDYHCGADHGSGSNFVVV	FGGGTKLTVL
46	3B6v1	-D------	----E-----------------------------	----------T-----	----------

FIG. 2D

Seq ID No.	LÍNEA	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
47	Línea germinal				QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
48	20D10	VH1-18		JH6B	-I----------	--PL------	----------
49	26E10	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
49	21B12	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
50	23G1	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
51	26H5	VH1-18		JH6B	----------	---L------	----------
52	27H5	VH1-18		JH6B	----------R-----------	---L------	----------
53	31D1	VH1-18		JH6B	-I----------	---L------	----------
54	27E7	VH1-18		JH6B	----------L----------	--SL------	----------
55	30B9	VH1-18		JH6B	----------	--PL------	----------
56	19H9	VH1-18		JH6B	----------	--AL------	----------
57	17C2	VH1-18		JH6B	----------	--S-------	----------
58	25A7	VH1-18		JH6B	----------	----P-----	----------
59	Línea germinal				QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAPGQGLEWMG
60	3B6	VH1-18		JH4B	----------	----------	----------
61	Línea germinal				EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYWMS	WVRQAPGKGLEWVA
62	9H6	VH3-7	D7-27	JH3A	----------	-----R----	----------
63	Línea germinal				EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYWMS	WVRQAPGKGLEWVA
64	9C9	VH3-7	D7-27	JH3B	----------VV-	----------	----------
65	1A12	VH3-7	D7-27	JH3B	----------	-L---NF---	----------
66	Línea geminal				EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYSMN	WVRQAPGKGLEWVS
67	31H4	VH3-21	D3-3	JH3A	----------	----------	----------
68	Línea germinal				EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
69	13B5	VH3-23		JH4B	----------	----------	----------

FIG. 3A

Seq ID No.	LÍNEA	V	D	J	FR1	CDR1	FR2
70	Línea germinal				EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
71	23B5	VH3-23	D2-8	JH4B	----------	----------N	----------
72	25G4	VH3-23	D2-8	JH4B	----------	----------N	----------
73	Línea germinal				QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
74	30A4	VH3-33		JH6B	----------	----------	----------
75	Línea germinal				QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
76	27A6	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-------	----N-F---	----------
77	28B12	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	-------F--	----------
289	28B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-------	-------F--	----------
78	28D6	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	-------F--	----------
79	16F12	VH3-33	D6-6	JH6B	--H-------	----N-F---	----------
80	22E2	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	-------F--	----------
81	31B12	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	----------	----------
290	31B12v1	VH3-33	D6-6	JH6B	----------	----------	----------C--
82	Línea germinal				QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
83	31G11	VH3-33	D6-19	JH6B	----------	----R-----	----------
84	Línea germinal				QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GGSISSGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG
85	3C4	VH4-31		JH6B	----------	------SD----	----------
86	Línea germinal				QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	GGSISSGGYYWS	WIRQHPGKGLEWIG
87	27B2	VH4-31	D5-5	JH4B	----------	----------	----------
88	Línea germinal				QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY	GGSFSGYYWS	WIRQPPGKGLEWIG
89	31A4	VH4-34	D6-6	JH4B	----------	-----A---N	----------
90	Línea germinal				QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS	GDSVSSNSAAWN	WIRQSPSRGLEWLG
91	13H1	VH6-1		JH4B	----------	----------	----------

FIG. 3B

Seq ID No.	LÍNEA	CDR2	FR3	CDR3	FR4
47		WISAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	YGMDV	WGQGTTVTVSS
48	20D10	----------V--	S----------V----------	G-----	----------
49	26E10	-V-F----------	-G-----P----------	G-----	----------
49	21B12	-V-F----------	-G-----P----------	G-----	----------
50	23G1	-V-F----------	-G-----P----------	G-----	----------
51	26H5	---F---------V--	----------V----------	G-----	----------
52	27H5	---V---------V--	----------V-------S----------	G-----	----------
53	31D1	---F---------V--	----------V----------F---	G-----	----------
54	27E7	----------V--	----------V---V----------	G-----	----------
55	30B9	----------V--	----------V----------	G-----	----------
56	19H9	----------V--	----------V----------	G-----	----------
57	17C2	-V----------F--	----------	G-V---	----------
58	25A7	----------E-----	----------V----------F-----	G-V---	----------
59		WISAYNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	GY DY	WGQGTLVTVSS
60	3B6	---T---------V--	----------	--TR--	----------
61		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	NWG AFDV	WGQGTMVTVSS
62	9H6	---H----------	----------	ES---F----	--H--------
63		NIKQDGSEKYYVDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	NWG AFDI	WGQGTMVTVSS
64	9C9	----------	----------	ES---F----	----------
65	1A12	----------	----------S-T-	ES---F----	----------
66		SISSSSSYIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DYDFWSGYYTAFDV	WGQGTMVTVSS
67	31H4	----------S--------	----------F---	------A--D----	----------
68		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	FDY	WGQGTLVTVSS
69	13B5	T-------R----------	----------	EVGSP---	----------

FIG. 3C

FIG. 3D

Seq ID No.	LÍNEA	CDR2	FR3	CDR3	FR4
70		AISGSGGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	VLMVYA DY	WGQGTLVTVSS
71	23B5	T-----DN---------	--------------------------------	KF------ML--	-----------
72	25G4	T------N---------	--------------------------------	KF------ML--	-----------
73		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
74	30A4	-------D---------	--------------------------------	ETGPLKL--------	-----------
75		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	IAA GMDV	WGQGTTVTVSS
76	27A6	L--S---D---------	--------------------------------	AIAALYYYY----	-----------
77	28B12	L--N-------------	--------------------------------	AIAALYYYY----	--H--------
78	28D6	L--N-------------	--------------------------------	AIAALYYYY----	-----------
79	16F12	L--S---DE--------	--------------------------------	AIAALYYYY----	-----------
80	22E2	L--N-------------	--------------------------------	AIAALYYYY----	-----------
291	22E2v1	L--N-------------	--------------------------------	AIAALYYYY----	-----------
81	31B12	I----------------	--------------------------------	RGGLAARPG----	-----------
290	31B12v1	I----------------	--------------------------------	RGGL---PG----	-----------
82		VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GIAVAYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
83	31G11	L--E-----T--V----	--------------------------------	-------------	-----------
84		YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	YYYGMDV	WGQGTTVTVSS
85	3C4	----------------	-I---------L--------------------	GGVTT---A---	-----------
86		YIYYSGSTYYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	EDTAMV YFDY	WGQGTLVTVSS
87	27B2	---N------------	--------------------------------	------P----	-----------
88		EINHSGSTNYNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	GQLV FDY	WGQGTLVTVSS
89	31A4	-------R-D------	----------K------N--------------	----D----	-----------
90		RTYYRSKWYNDYAVSVKS	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR	FDY	WGQGTLVTVSS
91	13H1	---------KN-S-----	----------------------G---------	GGPTAA---	-----------

31H4

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:
5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTAGT
TACATTTCCTACGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTTCTGTGCGAGAGATTACGATTTTTGGAGTGCTTACTATGATGCTTTTGATGTCTGG
GGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 152)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYISY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDYDFWSAYYDAFDVWGQGT
MVTVSS **(SEQ ID NO: 67)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGT
ACCAGCAGCTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTCTGGTAACAGCAATCGGC
CCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACA
GCAGCCTGAGTGGTTCGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 153)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLISGNSNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 12)**

FIG. 3E

20D10

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:
5'CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACCCCTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGCGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 92)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN
TNYAQKVQGSVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTV
SS **(SEQ ID NO: 48)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGTACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCAAGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAA
GCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 93)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQYPGKPPKLKIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 19)**

FIG. 3F

26E10

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:
5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTCAGTTTTTATAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATC
CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 94)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVSFYNG
NTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVT
VSS **(SEQ ID NO: 49)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAATTCATATACAA
GCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 95)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 23)**

Secuencia de nucleótidos alternativa de la región variable de cadena pesada (26E10v1):
5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCATATACAA
GCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 293)**

FIG. 3G

26H5

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCTTTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 96)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISFYNGN
TNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTV
SS **(SEQ ID NO: 51)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTATTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAG
CACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 97)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSNRPSGV
SIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 17)**

FIG. 3H

31D1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCTTTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTTCTGTGCGAGAGGTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 98)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISFYNGNT
NYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYFCARGYGMDVWGQGTTVTVS
S **(SEQ ID NO: 53)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCGTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAA
GCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGCCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 99)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLAVL **(SEQ ID NO: 18)**

FIG. 3I

23G1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTCAGTTTTTATAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATC
CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 100)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVSFYNG
NTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVT
VSS **(SEQ ID NO: 50)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCACTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAACTCATATACAA
GCACCAGCATGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 101)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVTNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 26)**

FIG. 3J

27B2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT
CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGGTTACTACTGGAGCT
GGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATATATAACAGT
GGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACAC
GTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGAGGATACAGCTATGGTTCCTTACTTTGACTACTGGGGCCA
GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 102)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYNSGSTY
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDTAMVPYFDYWGQGTLVT
VSS **(SEQ ID NO: 87)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTACTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCACATTATGATGTGCACTGGT
ACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACACCTATCGGC
CCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACA
ACAGCCTGAGTGGTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 103)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAHYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGNTYRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDNSLSGVVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 13)**

FIG. 3K

16F12

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:
5'CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAACAGCTTTGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATCTGGTCTGATGGAAGT
GATGAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 104)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVALIWSDGSD
EYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIAALYYYYGMDVWGQ
GTTVTVSS **(SEQ ID NO: 79)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACTATAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGCCTGAGTGCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 105)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDYNKRPSGIPD
RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGTRVTVL **(SEQ ID NO: 35)**

FIG. 3L

22E2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTTGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATGGAATGATGGAAGT
AATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 106)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVALIWNDGSN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIAALYYYYGMDVWGQ
GTTVTVSS **(SEQ ID NO: 80)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACTATAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGTCTGAGTGGTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 107)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDYNKRPSGIPD
RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGYVFGTGTRVTVL **(SEQ ID NO: 36)**

FIG. 3M

27A6

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAACAGCTTTGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATGGTCTGATGGAAGT
GATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 108)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNSFGMHWVRQAPGKGLEWVALIWSDGSD
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIAALYYYYGMDVWGQ
GTTVTVSS **(SEQ ID NO: 76)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGTTCCAACATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTACC
AGCAGTTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACTATAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGCCTGAGTTCTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 109)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQFPGTAPKLLIYDYNKRPSGIPD
RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSSYVFGTGTRVTVL **(SEQ ID NO: 37)**

FIG. 3N

28B12

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTTGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATGGAATGATGGAAGT
AATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCACGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 110)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVALIWNDGSN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIAALYYYYGMDVWGH
GTTVTVSS **(SEQ ID NO: 77)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACTATAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGCCTGAGTGGTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 111)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDYNKRPSGIPD
RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGYVFGTGTRVTVL **(SEQ ID NO: 38)**

FIG. 30

28D6

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGCAGCTTTGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATGGAATGATGGAAGT
AATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGCCATAGCAGCCCTCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 112)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVALIWNDGSN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIAALYYYYGMDVWGQ
GTTVTVSS **(SEQ ID NO: 78)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCACAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACTATAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTACTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGCCTGAGTGGTTATGTCTTCGGAACTGGGACCAGGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 113)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPTVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDYNKRPSGIPD
RFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSGYVFGTGTRVTVL **(SEQ ID NO: 39)**

FIG. 3P

31G11

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGGAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTTATATGGCATGATGGAAGT
AATACATACTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGGTATAGCAGTGGCTTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 114)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIWHDGSN
TYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIAVAYYYYGMDVWGQ
GTTVTVSS **(SEQ ID NO: 83)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACAGTAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGACA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGCCTGAGTGCTTATGTTTTCGGAACTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 115)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNFVSWYQQLPGTAPKLLIYDSNKRPSGIPD
RFSGSKSGTSATLDITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL **(SEQ ID NO: 40)**

FIG. 3Q

2385

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTGGTAGTGGTGAT
AACACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT
ATTACTGTGCGAAAAAGTTTGTACTAATGGTGTATGCTATGCTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 116)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGDNT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKFVLMVYAMLDYWGQG
TLVTVSS **(SEQ ID NO: 71)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGTTATTTAAATTGGTATCAGCA
GAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCTGCCTCCAGTTTGCAAAGTGG
GGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAA
CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCCC
CATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA3' **(SEQ ID NO: 117)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DILMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQSYSSPITFGQGTRLEIK **(SEQ ID NO: 9)**

FIG. 3R

25G4

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGT
AACACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT
ATTACTGTGCGAAAAAGTTTGTACTAATGGTGTATGCTATGCTTGACTACTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 118)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGNT
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKFVLMVYAMLDYWGQG
TLVTVSS **(SEQ ID NO: 72)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTATCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCATCTATTTAAATTGGTATCAGCA
GAAGCCAGGGAAAGCCCCTTACCTCCTGATCTATGCTGCAGCCAGTTTGCAAAGTGG
GGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
CAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTGCCCC
CATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA3' **(SEQ ID NO: 119)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISIYLNWYQQKPGKAPYLLIYAAASLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSAPITFGQGTRLEIK **(SEQ ID NO: 10)**

FIG. 3S

27E7

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCACTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGTTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGGTGAGGAGTCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 120)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASLKVSCKASGYSLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN
TNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMEVRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTV
SS **(SEQ ID NO: 54)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAATACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAA
GCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 121)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 20)**

FIG. 3T

27H5

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAGGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGTTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGCTCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 122)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYNGN
TNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLSSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTV
SS **(SEQ ID NO: 52)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTATTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAAG
CACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 123)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSNRPSGV
SIRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 16)**

FIG. 3U

30B9

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACCCCTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGTTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 124)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYPLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN
TNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTV
SS **(SEQ ID NO: 55)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAATACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAA
GCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 125)**

Secuencia de nucleótidos alternativa de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAA
GCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 294)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 21)**

FIG. 3V

19H9

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGTTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACGCCTTGACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 126)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYALTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN
TNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTVYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVTV
SS **(SEQ ID NO: 56)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAACAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGATTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTTCTGCAGCTCATATACAA
GCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 127)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTNSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSNRPSGI
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 22)**

FIG. 3W

17C2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACAGCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTCAGCGCTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGCCTACATGGAACTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 128)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVSAYNG
NTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYVMDVWGQGTTVT
VSS **(SEQ ID NO: 57)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTTTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGCTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACGCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAA
GCACCAACATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 129)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGAYNSVSWYQQHPGKAPKRMIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSTNMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 24)**

FIG. 3X

13H1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTACAGTTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCT
CACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAACT
GGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGG
TCCAAGTGGTATAAAAATTATTCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCA
GACACATCCAAGAACCAGTTCTCTCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGGGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGGGGGCCAACTGCTGCTTTTGACTACTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 130)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK
WYKNYSVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPGDTAVYYCARGGPTAAFDYWGQGTL
VTVSS **(SEQ ID NO: 91)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CTTTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGAATTATAACCTTGTCTCCTGGTA
CCAACAGTATTCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAAGCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCTGCTCATATGCAG
GTAGTAGCACTTTGGTTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 131)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

LSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGNYNLVSWYQQYSGKAPKLMIYEVSKRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYAGSSTLVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 28)**

FIG. 3Y

9C9

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGTAGTCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGT
GAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC
CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTAT
ATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACTGGGGATTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGA
CAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 132)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSE
KYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESNWGFAFDIWGQGTM
VTVSS **(SEQ ID NO: 64)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAAGACTGTAAACTGGTACC
AACAGGTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCC
TTAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCC
ATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTGCAGCATGGGATGAC
AGCCTGAATTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 133)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQVPGTAPKLLIYRNNQRPLGVP
DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 30)**

FIG. 3Z

9H6

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCGCTATTGGATGAGCTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCATGATGGAAGTG
AGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATTTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGAGTCAAACTGGGGATTTGCTTTTGATGTCTGGGGCCACGGGAC
AATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 134)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKHDGSE
KYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESNWGFAFDVWGHGT
MVTVSS **(SEQ ID NO: 62)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGCCCCCCGGACAGAGGGTCA
CCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCT
CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA
TCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACA
GCCTGAATTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 135)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSASGPPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNRRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 31)**

FIG. 3AA

13B5

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTGGTAGTGGTGGT
AGGACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT
ATTACTGTGCGAAAGAAGTTGGCAGTCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG
TCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 136)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGRTY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEVGSPFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 69)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCA
CCATCTCCTGCTCTGGAAGCAACTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTACC
AGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACAATAATAAGCGACCCT
CAGGGATTCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCA
TCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATAGC
AGCCTGAGTGCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 137)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSNSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIP
DRFSGSNSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAVVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 42)**

FIG. 3BB

31B12

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:
5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTATGATGGAAGT
AATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACACTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGGAGGGGGGGTCTGGCAGCTCGTCCGGGCGGTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 138)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGLAARPGGMDVWG
QGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 81)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCTGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAG
AATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAAATACCAAGTGGCCCTTAGGGAT
CCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGTCACTCTGACCATCAGCGG
GACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTG
TGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 139)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQNTKWPLGIPE
RFSGSKSGNTVTLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 44)**

Secuencia de nucleótidos alternativa de la región variable de cadena ligera:
5'TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAGCCA
GAATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGGATAAATATGCTTGCTGGTATCAGCAGA
AGCCAGGCCAGTCCCCTGTGCTGGTCATCTATCAAAATACCAAGTGGCCCTTAGGGA
TCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGGAACACAGTCACTCTGACCATCAGCG
GGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCACT
GTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 295)**

FIG. 3CC

3C4

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT
CCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTGATTACTACTGGAGCT
GGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGT
GGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAATTACCATATCAGTAGACAC
GTCTAAGAACCTGTTCTCCCTGAAGTTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACACGGCCGT
GTATTACTGTGCGAGAGGGGGGGTGACTACGTACTACTACGCTATGGACGTCTGGG
GCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 140)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSSDYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTY
YNPSLKSRITISVDTSKNLFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGVTTYYYAMDVWGQGTTV
TVSS **(SEQ ID NO: 85)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GACATACAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGT
CACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGCGCATTAGCAACTATTTAAGTTGGTATCTGCA
GAAACCAGGGATTGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAGAGTGG
GGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG
CAGTCTGCAATCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCC
GCTCATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' **(SEQ ID NO: 141)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRISNYLSWYLQKPGIAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFATYYCQQSYSTPLIFGGGTKVEIK **(SEQ ID NO: 7)**

FIG. 3DD

30A4

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:
5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGT
GATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTA
TTACTGTGCGAGAGAGACTGGTCCCTTGAAACTCTACTACTACGGTATGGACGTCTG
GGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 142)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSD
KYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETGPLKLYYYGMDVWG
QGTTVTVSS **(SEQ ID NO: 74)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:
5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGAGAGCCGCC
CTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTTTTTG
AATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAACTCCTGATCTATTTGGGTTCT
CATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTT
ACACTGGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCA
AGTTCTACAAACTCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA3'
(SEQ ID NO: 143)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:
DIVMTQSPLSLSVTPGEPPSISCRSSQSLLHSNGYNFLNWYLQKPGQSPQLLIYLGSHRAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCMQVLQTPFTFGPGTKVDIK **(SEQ ID NO: 5)**

FIG. 3EE

1A12

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTAGTAACTTTTGGATGAGCTGGGTCCG
CCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGT
GAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGC
CAAGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT
ATTCCTGTACGAGAGAGTCAAACTGGGGATTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGA
CAATGGTCACCGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 144)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSE
KYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYSCTRESNWGFAFDIWGQGTM
VTVSS **(SEQ ID NO: 65)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAAAACTGTAAACTGGTACC
AGCAGTTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCGGCGGCCCT
CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA
TCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACA
GCCTGAATTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 145)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNRRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGAGTKLTVL **(SEQ ID NO: 33)**

FIG. 3FF

3B6

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCACTTACAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTTT
ATTACTGTGCGAGAGGGTATACTCGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCA3' **(SEQ ID NO: 146)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYNGN
TNYAQKVQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYTRDYWGQGTLVTVS
S **(SEQ ID NO: 60)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACTTTTTGCATCAGCCTCCCTGGGAGCCTCGGTCAC
ACTCACCTGCACCCTGAGCAGCGGCTACAGTAGTTATGAAGTGGACTGGTATCAGCA
GAGACCAGGGAAGGGCCCCCGGTTTGTCATGCGAGTGGACACTGGTGGGATTGTGG
GATCCAAGGGGGAAGGCATCCCTGATCGCTTCTCAGTTTTGGGCTCAGGCCTGAATC
GGTATCTGACCATCAAGAACATCCAGGAAGAGGATGAGAGTGACTACCACTGTGGG
GCAGACCATGGCAGTGGGACCAACTTCGTGGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCT
GACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 147)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QPVLTQPLFASASLGASVTLTCTLSSGYSSYEVDWYQQRPGKGPRFVMRVDTGGIVGSK
GEGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHCGADHGSGTNFVVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 46)

FIG. 3GG

31A4

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGT
CCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGCGTACTACTGGAACTGGATCC
GCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGA
ACCGACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA
GAAGCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTA
CTGTGCGAGAGGGCAGCTCGTCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAC
CGTCTCTTCA3' **(SEQ ID NO: 148)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGRTD
YNPSLKSRVTISVDTSKKQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGQLVPFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 89)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAATTGGTATC
AGCAACTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCT
CAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCA
TCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGTATGGGATGACA
GCCTGAATGGTTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 149)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD
RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAVWDDSLNGWVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 32)**

FIG. 3HH

25A7

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTCCCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT
AACACAAACTATGCAGAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATC
CACGAGCACAGCCTACATGGAGGTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
TTTACTGTGCGAGAGGCTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 150)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFPSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGN
TNYAEKLQGRVTMTTDTSTSTAYMEVRSLRSDDTAVFYCARGYVMDVWGQGTTVTVS
S **(SEQ ID NO: 58)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTCGTTATAATTCTGTCTCCTGGTAC
CAACACCACCCAGGCAAAGCCCCCAAAGTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGCC
CTCAGGGGTTTCTACTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGAC
CATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATACAAG
CAGCAGCGTTGTATTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 151)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGRYNSVSWYQHHPGKAPKVMIYEVSNRPSGV
STRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSVVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 15)**

FIG. 3II

21B12

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGA
AGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTAACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGC
GACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTCAGTTTTTATAATGGT
AACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGGCACCATGACCACAGACCCATC
CACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGGCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCT3' **(SEQ ID NO: 94)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWVSFYNG
NTNYAQKLQGRGTMTTDPSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYGMDVWGQGTTVT
VSS **(SEQ ID NO: 49)**

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC
CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTCTCCTGGTA
CCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACTCATGATTTATGAGGTCAGTAATCGGC
CCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGA
CCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGCAATTCATATACAA
GCACCAGCATGGTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA3' **(SEQ ID NO: 296)**

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCNSYTSTSMVFGGGTKLTVL **(SEQ ID NO: 23)**

FIG. 3JJ

Dominios constantes

IgG2 humana:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 154)

IgG4 humana:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 155)

Lambda humana:

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 156)

Kappa humana:

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 157)

FIG. 3KK

5H5.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGGTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTC
AGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATAC
ACTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAA
CCCTCACAGTGGTGGCGCAAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACC
ATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGA
GATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCAACTGGAACTACGA
CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
3' (SEQ ID NO:418)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQVVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIN
PHSGGANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGNWNYD
YYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:419)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC
AGAGTCACCATCACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAGCCT
GGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATC
CACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTT
CTGTCAAAGGTATCAGATTGCCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGG
ATATCAAA3' (SEQ ID NO:420)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQRYQIAPFTFGPGTKVDIK (SEQ
ID NO:421)

FIG. 3LL

24F7.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATCTG
GTATGATGGAAGTACTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA3' (SEQ ID NO:422)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGSTKYYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHY
YYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 423)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCTATTATGCAACCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACTA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAACTCCCGGGACAGCATTGGTAACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:424)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYATWYQQKPRQAPVLVIYGKNYRP
SGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSIGNHLVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:425)

FIG. 3MM

22B11.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCTTGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATG
GTTAGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA3' (SEQ ID NO:426)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGLHWVRQAPGKGLEWVAVIWL
DGSNKYYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:427)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTATGGAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTTTGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAACTCACGGGACATCATTGGTGACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:428)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYGSWYQQKPRQAPVLVIFGKNNRP
SGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDIIGDHLLFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:429)

FIG. 3NN

30F1.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGGAACTATGGCATGCA
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGG
TTTGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACCA
TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCTAATGAACAGCCTGAG
AGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCAC
TACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CA3'(SEQ ID NO:430)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
FDGSNKYYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLLMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHY
YYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:431)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAGGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGAATCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAAATCCCGGGACATCATTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
ACTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:432)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPRQAPVLVIYGKNNRP
SGIPDRISGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGDHLVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:433)

FIG. 30O

24B9.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATG
GTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGATCGGGGACTGGACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:434)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDRGLDW
GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:435)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCTATTATGCAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAAGTCCCGGGACAGCAGTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:436)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYASWYQQKPRQAPVLVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSGDHLVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:437)

FIG. 3PP

24B9.2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGGGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTG
GTATGATGGAAGTAGTAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA3'(SEQ ID NO:438)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQVVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGSSKYYADSVKGRSTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHY
YYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:439)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCTATTATGCAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAAACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAAGTCCCGGGACAGCAGTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:440)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYASWYQQKPRQAPVLVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDSSGDHLVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:441)

FIG. 3QQ

20A5.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATG
GTATGATGGAAGTTATAAAGACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCACC
ATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
CTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA3' (SEQ ID NO:442)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLSLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWY
DGSYKDYADSVKGRSTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:443)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCTATTATGCAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTATTCTTGTCATCTATGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAATCACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAAATCCCGGGACATCATTGGTAACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACTAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:444)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPRQAPILVIYGKNNRPS
GIPDRFSGSTSGITASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGNHLLFGGGTKLTVL (SEQ
ID NO:445)

FIG. 3RR

20A5.2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGCGTCTGGGGGCAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCCTCAGTAGCTATGGCATGCA
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCCAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTCATATGG
TATGATGGAAGTAACAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGCCGATTCACCA
TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAG
AGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGTGGTTCGGGGAGT
CATCGCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:446)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVASGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGQGLEWVAVIW
YDGSNKYYAASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGSGSH
RYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:447)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAACCTATTATGCAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTATTCTTGTCATCTATGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACCTCAGGAATCACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAAATCCCGGGGACATCATTGGTAACCATCTGCTGTTCGGCGGAGGGACTAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:448)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYYASWYQQKPRQAPILVIYGKNNRPS
GIPDRFSGSTSGITASLTITGAQAEDEADYYCKSRDIIGNHLLFGGGTKLTVL (SEQ
ID NO:449)

FIG. 3SS

20E5.1 - versión1 (v1)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATG
GTATGATGGAGGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCATC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
TTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCGCC
TCA3' (SEQ ID NO:450)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGGNKYYADSVKGRSIISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHY
YYGMDVWGQGTTVTVAS (SEQ ID NO:451)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA
TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTCTGTC
TCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAACCCCCCAAACTCATGATTTATGAGG
TCAGTAATCGGCCCTCAGGGATTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGC
AACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATT
ATTTCTGCAGCTCATATACAAGCACCAGCATGGTCTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGGCCGTCCTA3' (SEQ ID NO:452)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQHPGKPPKLMIYEVSN
RPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYFCSSYTSTSMVFGGGTKLAVL
(SEQ ID NO:453)

FIG. 3TT

20E5.1 - versión1 (v2)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATG
GTATGATGGAGGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATCCATC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAGCACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTATTGTGCGAGGTCAGTGGCTGGTTACCA
TTATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCGCC
TCA3' (SEQ ID NO:454)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIW
YDGGNKYYADSVKGRSIISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSVAGYHY
YYGMDVWGQGTTVTVAS (SEQ ID NO:455)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACA
GTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAGGCTATTATGCAAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCAAGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAA
CCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCACGTCAGGAAACACA
GCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACT
GTAACTCCCGGGACAACATTGGTGACCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:456)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRGYYASWYQQKPRQAPVLVIYGKNNRP
SGIPDRFSGSTSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDNIGDHLVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:457)

FIG. 3UU

8A3.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAG
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAA
ACAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAACGCCAGGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTTGTATTAATGGT
GTATGATATAGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:458)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVLMVYD
IDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:459)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGC
CGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATAC
AACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
TCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGT
GGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATG
TTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTAGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:460)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO:461)

FIG. 3VV

11F1.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGAG
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAA
ACAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCGCC
ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCTTGTACTAATGGT
GTATGATATAGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:462)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFAISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDLVLMVYD
IDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:463)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCACCCCTGGAGAGC
CGGCCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGGTAC
AACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
TCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGT
GGATCAGGCACACATCTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATG
TTGGAGTTTATTACTGCATGCAAACTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:464)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTHLTLKISRVEAEDVGVYYCMQTLQTPLTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO:465)

FIG. 3WW

12H11.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGCCCAGCCTGGGAGGTC
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGC
ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATA
CTATGATGGAATTAATAAACACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGGGGACTGGACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:466)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIYY
DGINKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLDWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:467)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAG
AGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACA
GTAAGAACTACTTAGTTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCT
GCTCATTTACTGGGCCTCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTG
GCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGA
AGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAACAATATTATAGTACTCCGTGGACGTTCG
GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA3' (SEQ ID NO:468)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLVWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTK
VEIK (SEQ ID NO:469)

FIG. 3XX

11H4.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTAGTAACTTTTGGATGAG
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAA
GCAAGATGGAAATGATAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACTGGGGATT
TGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO:470)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGNDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESNWGFAF
DIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:471)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG
GTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAAAACTGTAA
ACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAA
TAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA
CCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTAT
TACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATTGGGTGTTCGGCGGAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:472)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNRRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWVFGAGTKLTVL
(SEQ ID NO:473)

FIG. 3YY

11H8.1

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACTCACCTTTAGTAACTTTTGGATGAG
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAA
GCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGA
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCAAACTGGGGATT
TGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA3' (SEQ ID NO:474)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSNFWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESNWGFAF
DIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:475)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGG
GTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAAAACTGTAA
ACTGGTACCAGCAGTTCCCAGGAACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAA
TAATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCA
CCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTAT
TACTGTGCAACATGGGATGACAGACTGAATTGGGTGTTCGGCGCAGGGACCA
AGCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:476)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNRRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRLNWVFGAGTKLTVL
(SEQ ID NO:477)

FIG. 3ZZ

11G1.5

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTGTGCTGGTGAAACCCACAGAGACC
CTCACGCTGACCTGCACCGTCTCTGGGTTCTCACTCAGCAATGTTAGAATGGG
TGTGAGCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGGAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC
ATTTTTTCGAATGACGAAAATTCCTACAGAACATCTCTGAAGAGCAGGCTCA
CCATCTCCAAGGACACCTCCAAAAGCCAGGTGGTCCTTACCATGACCAACAT
GGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGGATAGTGGGAGCTACA
ACGGATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTC
A3' (SEQ ID NO:478)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNVRMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
NDENSYRTSLKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIVGATTDDAF
DIWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:479)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGGCCCCAGGACAGACG
GCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAAGTGTGCACTGGT
ACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCTGTGCTGGTCGTCTATGATGATAGCGA
CCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACTCTGGGAACACG
GCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTTTTACT
GTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCCTGTGGTATTCGGCGGAGGGACCAA
GCTGACCGTCCTA3' (SEQ ID NO:480)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADFYCQVWDSSSDPVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO:481)

FIG. 3AAA

8A1.2

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada:

5'GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC
CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGAC
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAA
GCAAGATGGAAGTGAGAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACC
ATCTCCCGAGACACCGCCAAGAACTCTCTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGC
GAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACCTCTTGTACTAATGGT
GTATGCTCTACACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCACGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCA3' (SEQ ID NO:482)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVASIKQ
DGSERYYVDSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLVLMVYA
LHYYYYGMDVWGHGTTVTVSS (SEQ ID NO:483)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera:

5'GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGC
CGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATAC
AACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGA
TCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGT
GGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATG
TTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA3' (SEQ ID NO:484)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera:

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVEI
K (SEQ ID NO:485)

FIG. 3BBB

FIG. 3CCC

Variable pesada	SEQ ID NO:			FR1	CDR1	FR2
		Línea germinal	Línea germinal			
	493	VH1|1-02		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	GYTFTGYYMH	WVRQAPGQGLEWMG
5H5.1G	419	VH1|1-02	JH6	---Y----------	-------I-	----------
		Línea germinal	Línea germinal	FR1	CDR1	FR2
	494	VH3|3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
24B9.1G	435	VH3|3-33	JH4	----------	---------	----------
		Línea germinal	Línea germinal	FR1	CDR1	FR2
	495	VH3|3-33		QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS	GFTFSSYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
24F7.1G	423	VH3|3-33	JH6	----------	---------	----------
22B11.1G	427	VH3|3-33	JH6	----------	-------L-	----------
20A5.1G	443	VH3|3-33	JH6	----------S-----	---------	----------
20A5.2G	447	VH3|3-33	JH6	-----A----------	---L-----	-------Q---
30F1.1G	431	VH3|3-33	JH6	----------S-----	---SN----	----------
20E5.1GV1	451	VH3|3-33	JH6	----V----------	----N----	----------
24B9.2G	439	VH3|3-33	JH6	---V----------G-	-----N----	----------

FIG. 3DDD

Variable pesada	SEQ ID NO:	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	493	WINPNSGGTNYAQKFQG	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR		
5H5.1G	419	----H---A-------	----------------------------------	GWWNYGYYGMDV	WGQGTTVTVSS
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	494	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
24B8.1G	435	----------------	----------------------------V-	DRGLDWGQGTLVTVSS	
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	495	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR		
24F7.1G	423	-------T--------	-S----------------------------	SVAGYHYYGMDV	WGQGTTVTVSS
22B11.1G	427	---I------------	-S----------------------------	SVAGYHYYGMDV	WGQGTIVTVSS
20A5.1G	443	-------Y-D-------	-S----------------------------	SVAGYHYYGNDV	WGQGTVVTVSS
20A5.2G	447	----------A-----	----------------------------	GGGSGSHRYYYYGMDV	WGQGTTVTVSS
30F1.1G	431	---F------------	-S-----------L----------------	SVAGYHYYGMDV	WGQGTVVTVSS
20E5.1GV1	451	------G---------	-SI------S----------------------	SVAGYHYYGMDV	WGQGTLVTVAS
24B9.2G	439	-------S--------	-S----------V----------------	SVAGYHYYGMDV	WGQGTLVTVSS

	SEQ ID NO:			FR1	CDR1	FR2
		Linea germinal	Linea germinal			
Variable kappa						
	496	VK1|A20		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISNYLA	WYQQKPGKVPKLLIY
5H5.1K	421	VK1|A20	JK3	----------D------	---D------	----------------
Variable lambda						
		Linea germinal	Linea germinal	FR1	CDR1	FR2
	497	VL2|2a2		QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTSSDVGGYNYVS	WYQQHPGKAPKLMIY
20E5.1L v1	453	VL2|2a2	JL2	----------P------	---------S---	---------P------

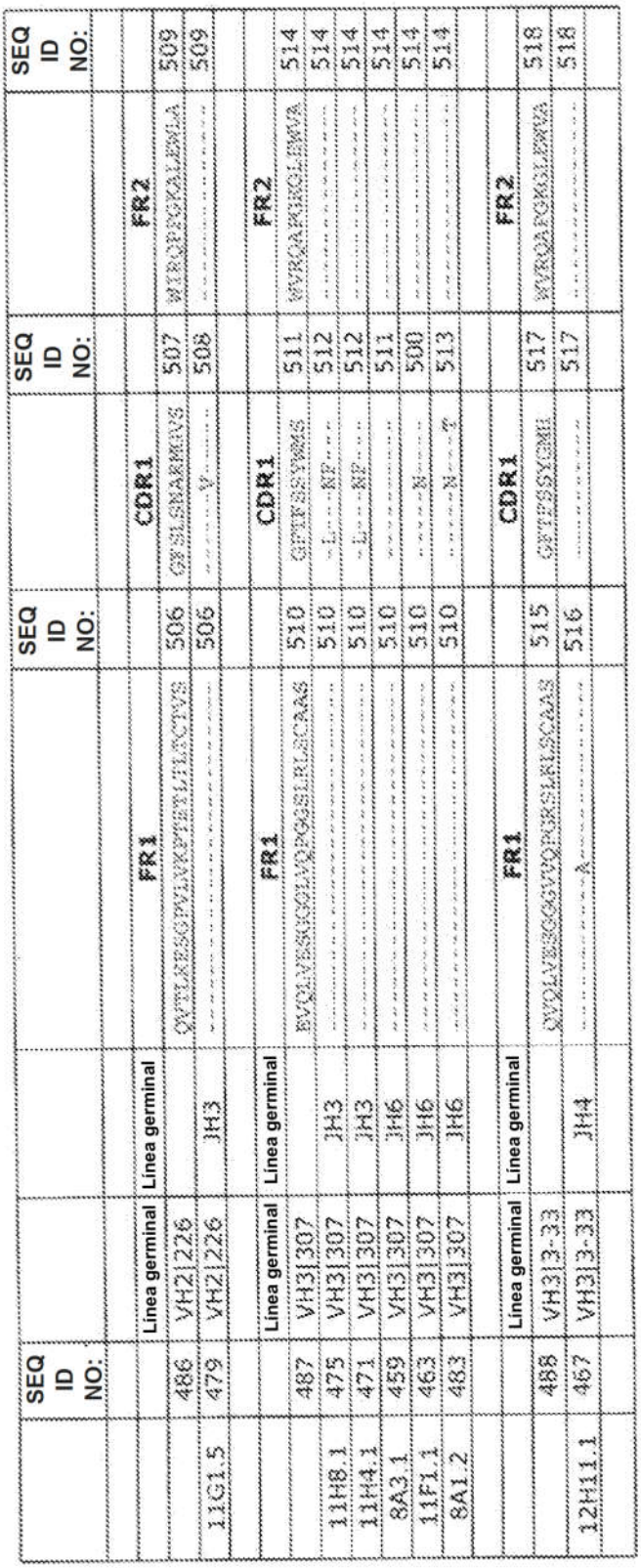
		Linea germinal	Linea germinal	FR1	CDR1	FR2
	498	VL3|3l		SSELTQDPAVSVALGQTVRITC	QGDSLRSYYAS	WYQQKPGQAPVLVIY
30F1.1L	433	VL3|3l	JL2	----------------------	----------	---------R------
22B11.1L	429	VL3|3l	JL2	----------------------	---------G-	---------R-------F
24B9.1L	437	VL3|3l	JL2	----------------------	---------G----	---------R------
24B9.2L	441	VL3|3l	JL2	----------------------	---------G----	---------R------
20E5.1L v2	457	VL3|3l	JL2	----------------------	---------G----	---------R------
24F7.1L	425	VL3|3l	JL2	----------------------	---------G---T	---------R------
20A5.1L	445	VL3|3l	JL2	----------------------	---------T----	---------R---I---
20A5.2L	449	VL3|3l	JL2	----------------------	---------T----	---------R---I---

FIG. 3EE

Variable kappa	SEQ ID NO:	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	496	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC		
5H5.1K	421	--------	---------------------------F-	QRYQIAPFT	FGQGTKVDIK
Variable lambda					
		CDR2	FR3	CDR3	FR4
	497	EVSNRPS	GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC		
20E5.1L v1	453	--------	-T-------------------------E-	SSYTSTSMV	FGGGTKLAVL

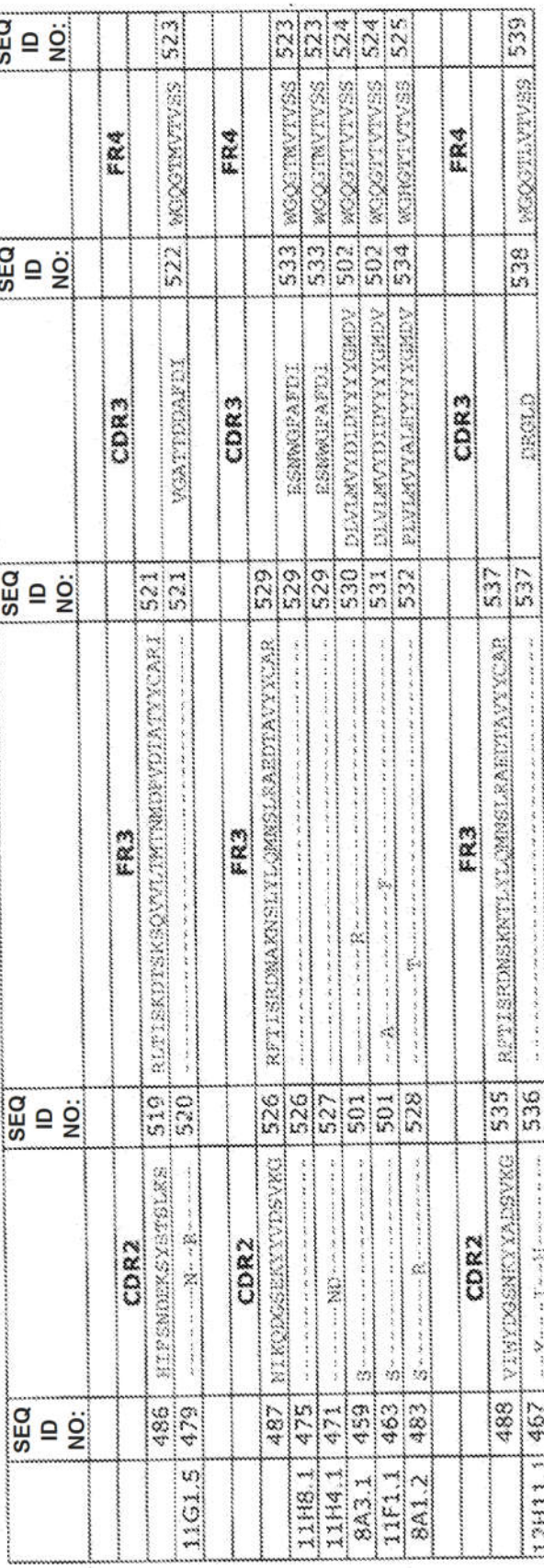
	SEQ ID NO:	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	498	GKNNRPS	GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC		
30F1.1L	433	--------	-----I---T----------------------	KSRDIGDHLV	FGGGTKLTVL
22B11.1L	429	--------	----------T----------------------	NSRDIGDHLL	FGGGTKLTVL
24B9.1L	437	--------	----------T----------------------	KSRDSSGDHLV	FGGGTKLTVL
24B9.2L	441	--------	----------T----------------------	KSRDSSGDHLV	FGGGTKLTVL
20E5.1L v2	457	--------	----------T----------------------	NSRDNIGDHLV	FGGGTKLTVL
24F7.1L	425	---Y----	----------T----------------------	NSRDSIGNHLV	FGGGTKLTVL
20A5.1L	445	--------	----------T---I------------------	KSRDIIGNHLL	FGGGTKLTVL
20A5.2L	449	--------	----------T---I------------------	KSRDIIGNHLL	FGGGTKLTVL

FIG. 3FFF



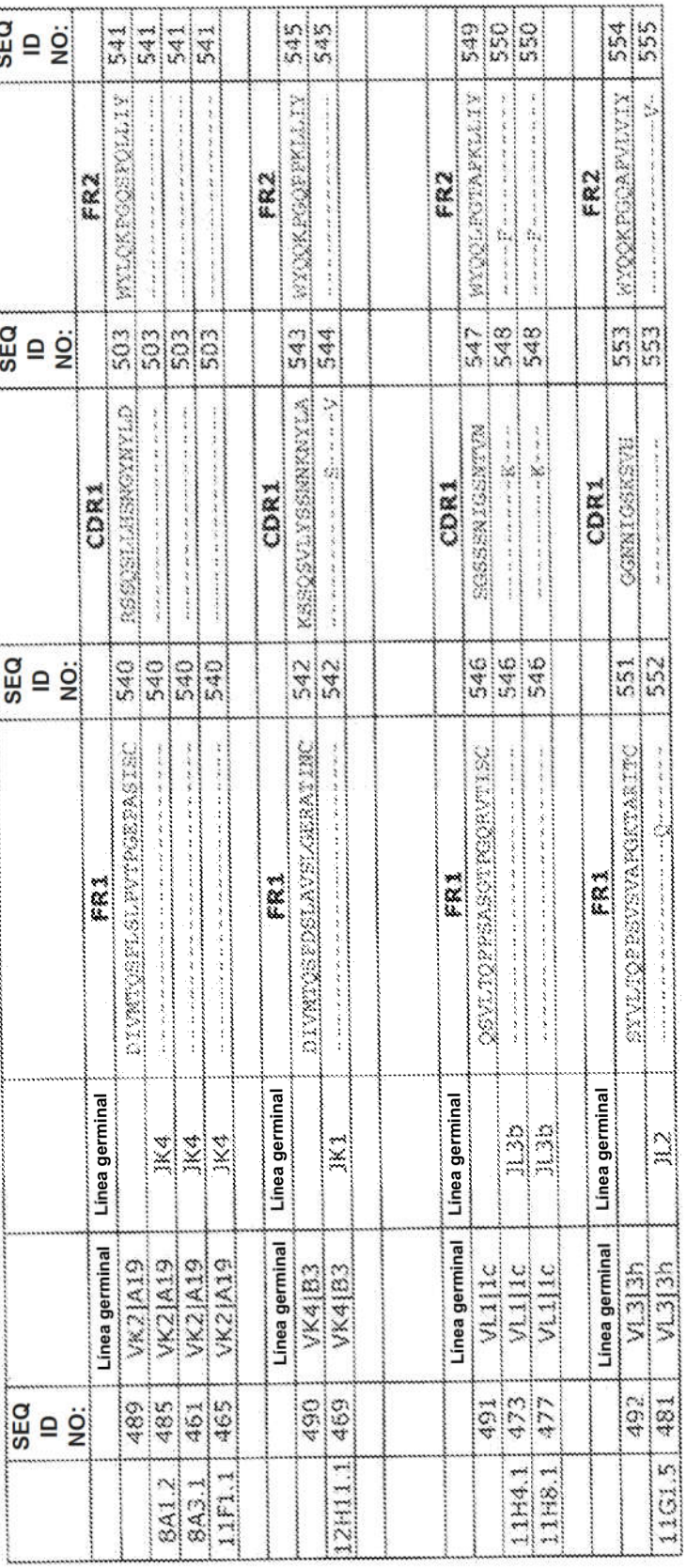
	SEQ ID NO:					SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
				FR1			CDR1		FR2	
		Línea germinal	Línea germinal	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVS		506	GFSLSNARMGVS	507	WIRQPPGKALEWLA	509
	486	VH2|26								
11G1.5	479	VH2|26	JH3	----------		506	------V------	508	----------	509
				FR1			CDR1		FR2	
		Línea germinal	Línea germinal	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS		510	GFTFSSYWMS	511	WVRQAPGKGLEWVA	514
	487	VH3|307								
11H8.1	475	VH3|307	JH3	----------		510	-L---NF---	512	----------	514
11H4.1	471	VH3|307	JH3	----------		510	-L---NF---	512	----------	514
8A3.1	459	VH3|307	JH6	----------		510	----------	511	----------	514
11F1.1	463	VH3|307	JH6	----------		510	-----N-----	500	----------	514
8A1.2	483	VH3|307	JH6	----------		510	-----N---T	513	----------	514
				FR1			CDR1		FR2	
		Línea germinal	Línea germinal	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAAS		515	GFTFSSYGMH	517	WVRQAPGKGLEWVA	518
	488	VH3|3-33								
12H11.1	467	VH3|3-33	JH4	----------A----------		516	----------	517	----------	518

FIG. 3GG



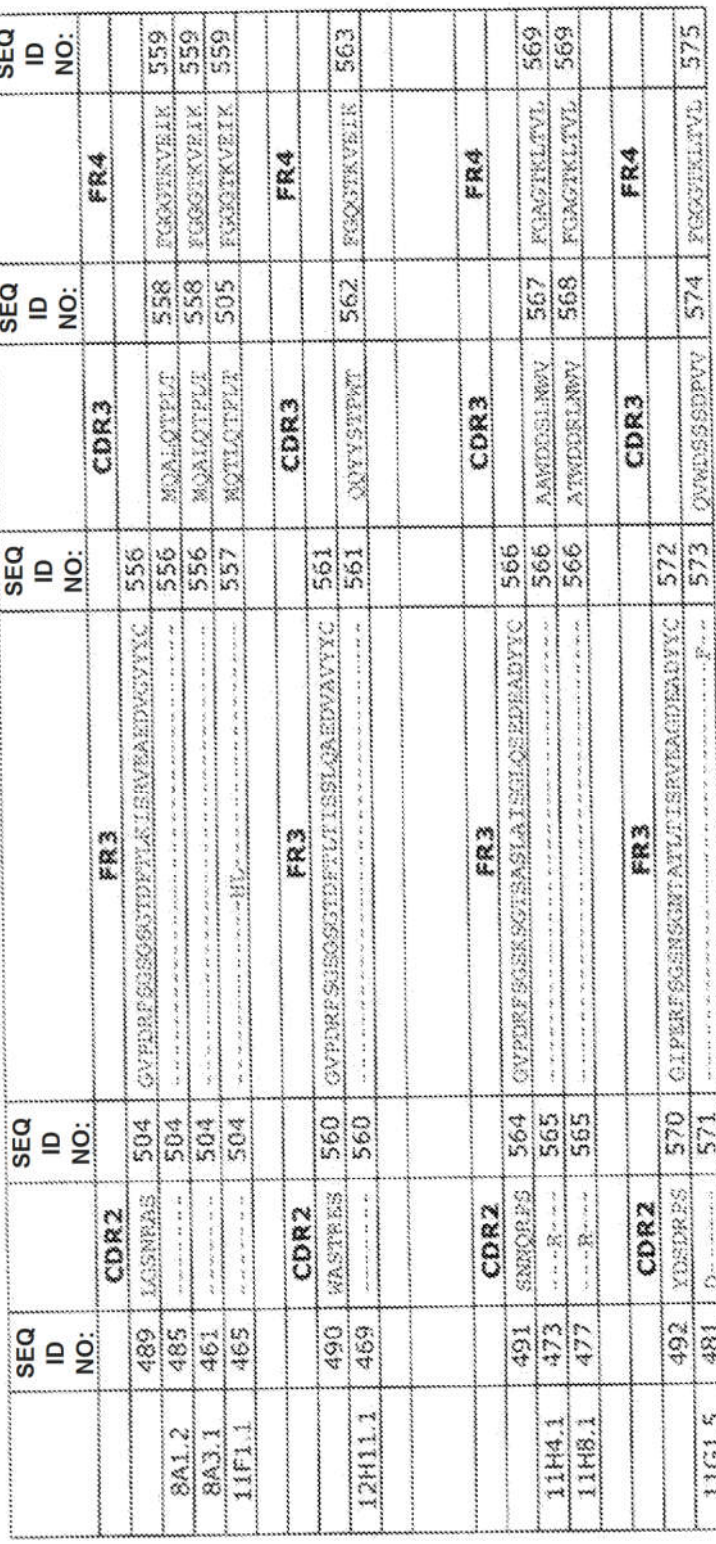
	SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	486	HIPSMDEKSYSTSLKS	519	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARI	521				
11G1.5	479	----------N--A------	520	----------	521	VGATTDDAFDI	522	WGQGTMVTVSS	523
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	487	MIKQDGSEKYYVDSVKG	526	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	529				
11H8.1	475	----------	526	----------	529	ESMNGPAFDI	533	WGQGTMVTVSS	523
11H4.1	471	----------ND----------	527	----------	529	ESMNGPAFDI	533	WGQGTMVTVSS	523
8A3.1	459	S----------	501	----------R----------	530	DLYDMVYDDLDVYYYGMDV	502	WGQGTTVTVSS	524
11F1.1	463	S----------	501	---A----------	531	DLVLMVTDDAVFYYYGMDV	502	WGQGTTVTVSS	524
8A1.2	483	S----------R----------	528	----------T----------	532	PLVLMVYALAFYYYGMDV	534	WGHGTTVTVSS	525
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	488	VIWYDGSNQYYADSVKG	535	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	537				
12H11.1	467	---Y----I--H----------	536	----------	537	DRGLD	538	WGQGTLVTVSS	539

FIG. 3HHH



	SEQ ID NO:					SEQ ID NO:		SEQ ID NO:		SEQ ID NO:
		Línea germinal	Línea germinal	FR1			CDR1		FR2	
	489	VK2|A19		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC		540	RSSQSLLHSNGYNYLD	503	WYLQKPGQSPQLLIY	541
	485	VK2|A19	JK4	.....		540	.....	503	.....	541
8A1.2	461	VK2|A19	JK4	.....		540	.....	503	.....	541
8A3.1	465	VK2|A19	JK4	.....		540	.....	503	.....	541
11F1.1										
		Línea germinal	Línea germinal	FR1			CDR1		FR2	
	490	VK4|B3		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC		542	KSSQSVLYSSNNKNYLA	543	WYQQKPGQPPKLLIY	545
12H11.1	469	VK4|B3	JK1	.....		542	..... S..... V	544	.....	545
		Línea germinal	Línea germinal	FR1			CDR1		FR2	
	491	VL1|1c		QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC		546	SGSSSNIGSNTVN	547	WYQQLPGTAPKLLIY	549
11H4.1	473	VL1|1c	JL3b	.....		546	..... K.....	548	..... P.....	550
11H8.1	477	VL1|1c	JL3b	.....		546	..... K.....	548	..... P.....	550
		Línea germinal	Línea germinal	FR1			CDR1		FR2	
	492	VL3|3h		SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC		551	GGNNIGSKSVH	553	WYQQKPGQAPVLVIY	554
11G1.5	481	VL3|3h	JL2	..... S.....		552	.....	553	..... V.....	555

FIG. 3III



	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	FR3	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:	FR4	SEQ ID NO:
	489	LASNRES	504	GVPDRFSGSGSGTDFTLRVEAEDVGVYYC	556				
8A1.2	485	----------	504	----------	556	MQALQTPLT	558	FGQGTKVEIK	559
8A3.1	461	----------	504	----------	556	MQALQTPLT	558	FGQGTKVEIK	559
11F1.1	465	----------	504	----------H-	557	MQTLQTPLT	505	FGQGTKVEIK	559
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	490	WASTRES	560	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	561				
12H11.1	469	----------	560	----------	561	QNYYSTPWT	562	FGQGTKVEIK	563
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	491	SNNQRPS	564	QVTDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC	566				
11H4.1	473	----R---	565	----------	566	AAWDDSLNGV	567	FGAGTKLTVL	569
11H8.1	477	----R---	565	----------	566	ATWDDSLNGV	568	FGAGTKLTVL	569
		CDR2		FR3		CDR3		FR4	
	492	YDSDRPS	570	GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC	572				
11G1.5	481	D---------	571	----------R--	573	QVWDSSSDPVV	574	FGGGTKLTVL	575

FIG. 3JJ

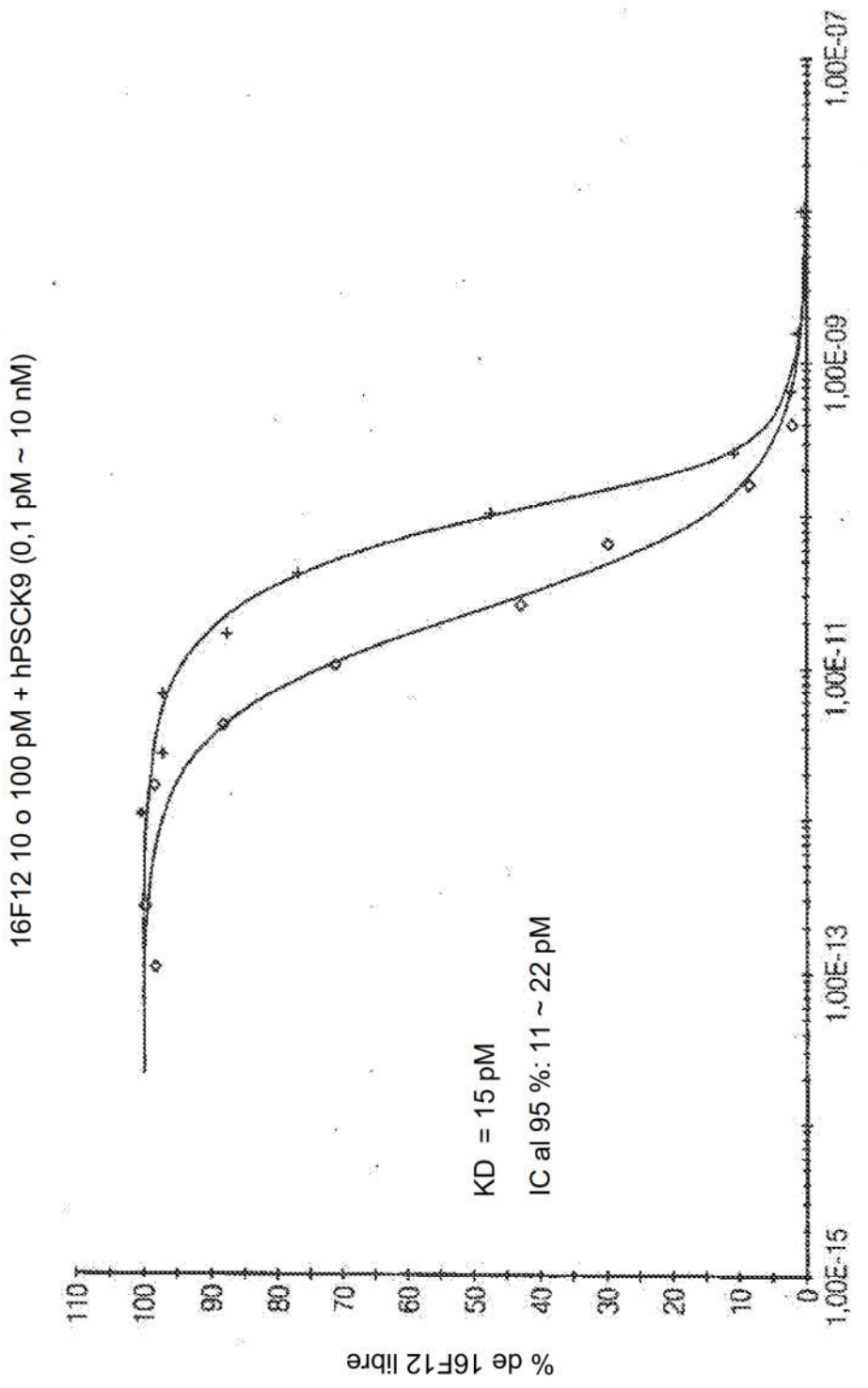

16F12 10 o 100 pM + hPSCK9 (0,1 pM ~ 10 nM)
KD = 15 pM
IC al 95 %: 11 ~ 22 pM
% de 16F12 libre
[hPCSK9] (M)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1,00E-15
1,00E-13
1,00E-11
1,00E-09
1,00E-07

FIG. 4A

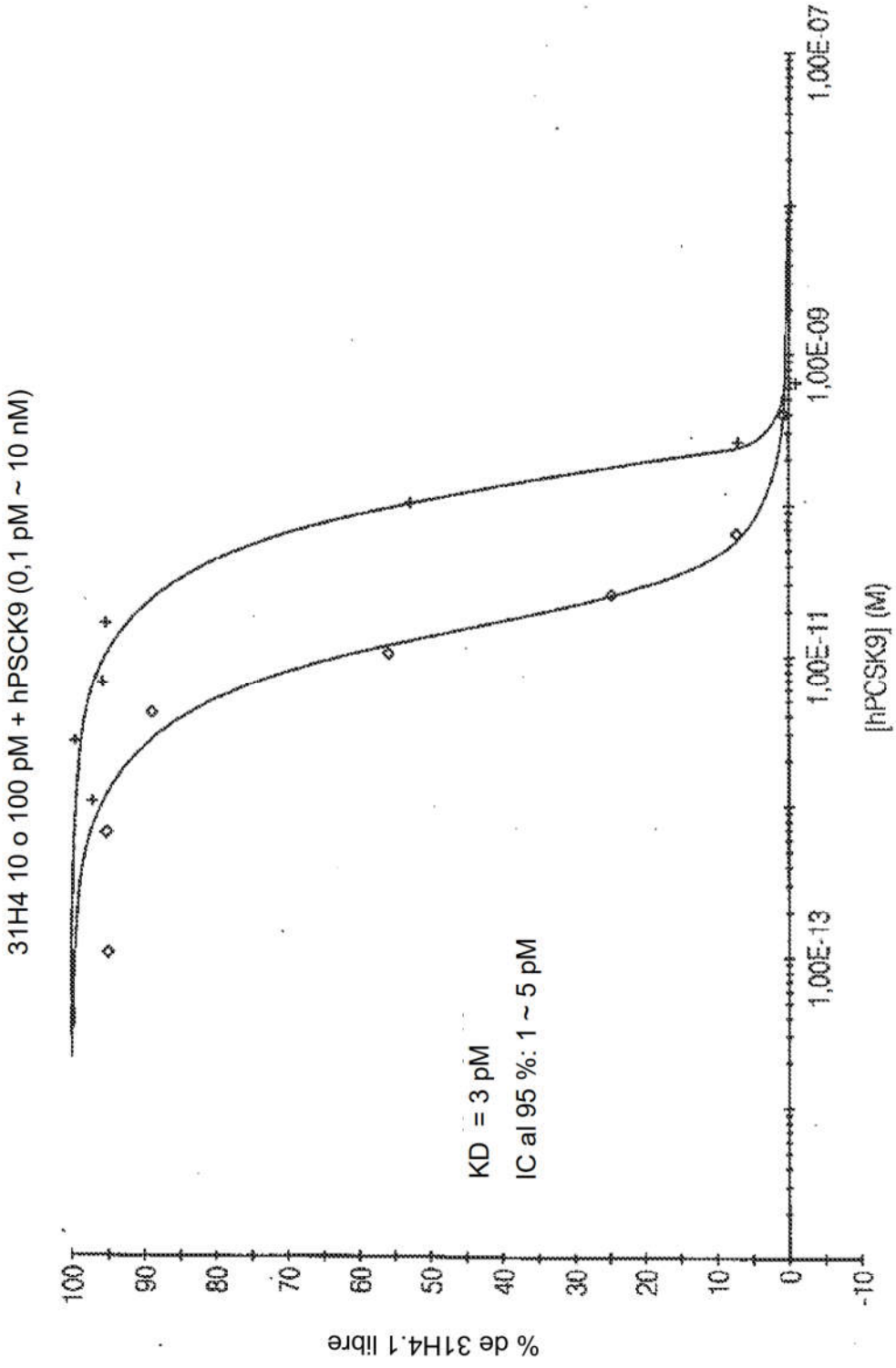

31H4 10 o 100 pM + hPSCK9 (0,1 pM ~ 10 nM)
KD = 3 pM
IC al 95 %: 1 ~ 5 pM
% de 31H4.1 libre
[hPCSK9] (M)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
1,00E-13
1,00E-11
1,00E-09
1,00E-07

FIG. 4B

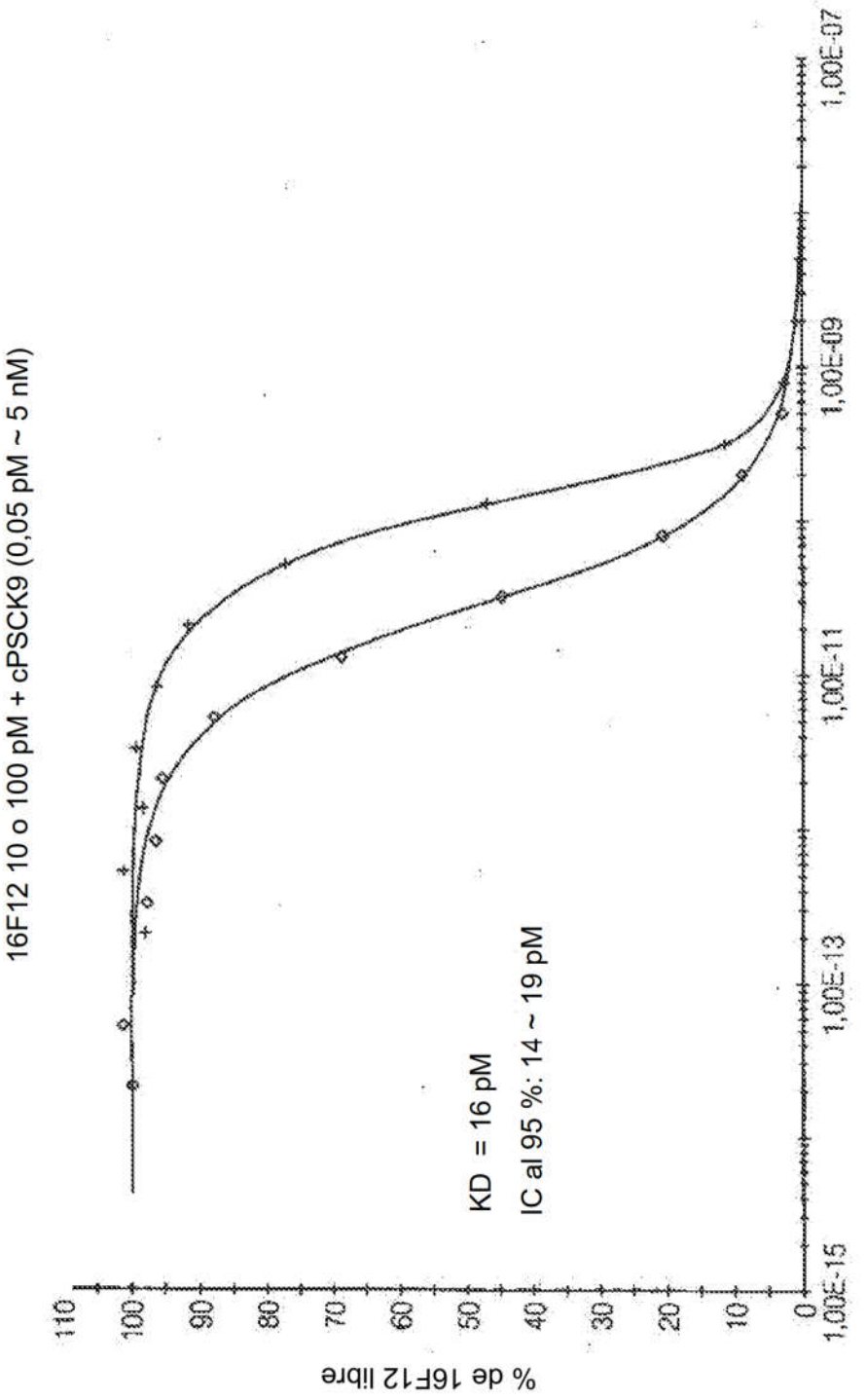

16F12 10 o 100 pM + cPSCK9 (0,05 pM ~ 5 nM)
KD = 16 pM
IC al 95 %: 14 ~ 19 pM
% de 16F12 libre
[cPCSK9] (M)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1,00E-15
1,00E-13
1,00E-11
1,00E-09
1,00E-07

FIG. 4C

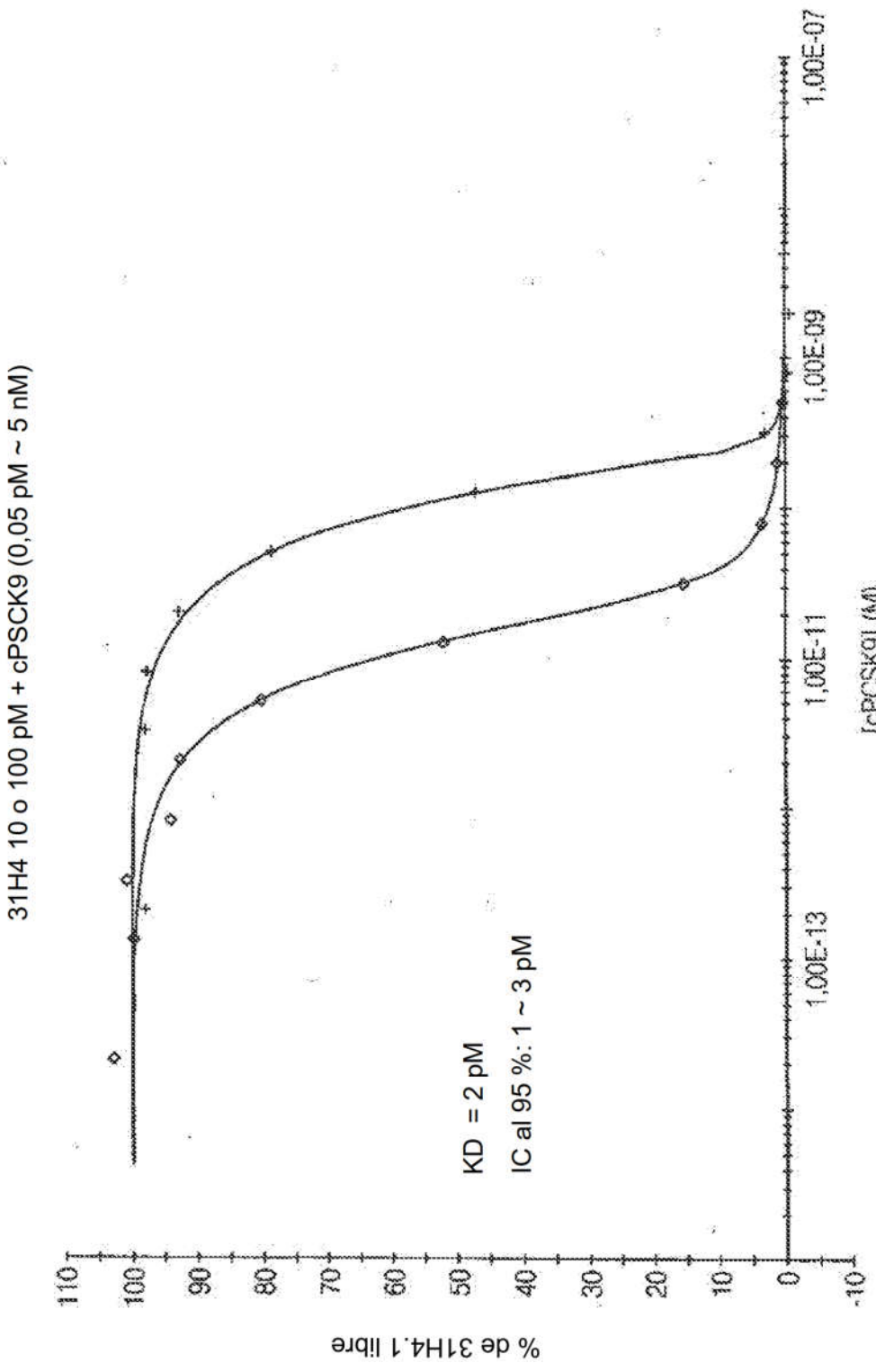

31H4 10 o 100 pM + cPSCK9 (0,05 pM ~ 5 nM)
KD = 2 pM
IC al 95 %: 1 ~ 3 pM
% de 31H4.1 libre
[cPCSK9] (M)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
1,00E-13
1,00E-11
1,00E-09
1,00E-07

FIG. 4D

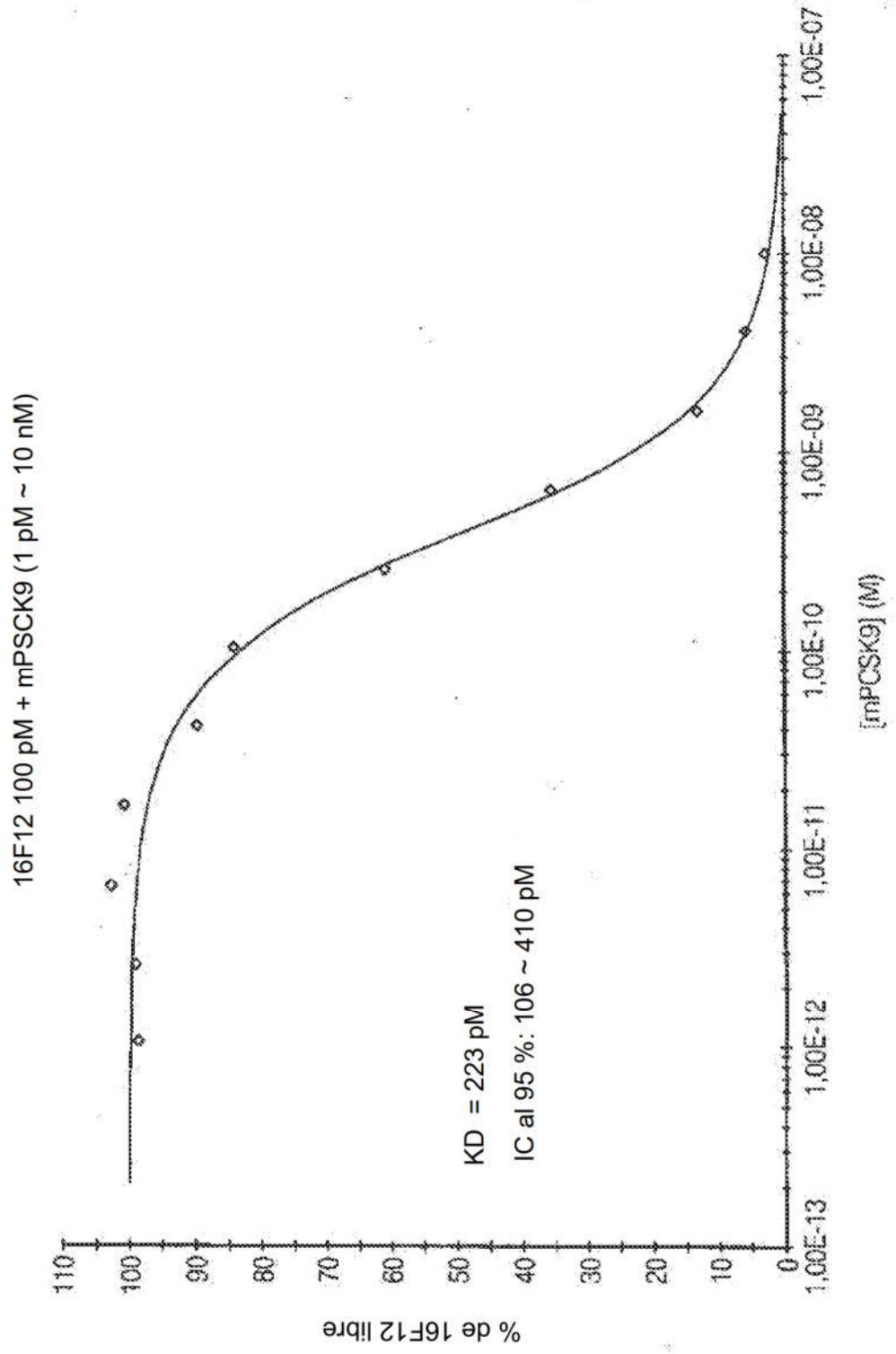

16F12 100 pM + mPSCK9 (1 pM ~ 10 nM)
KD = 223 pM
IC al 95 %: 106 ~ 410 pM
% de 16F12 libre
[mPCSK9] (M)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1,00E-13
1,00E-12
1,00E-11
1,00E-10
1,00E-09
1,00E-08
1,00E-07

FIG. 4E

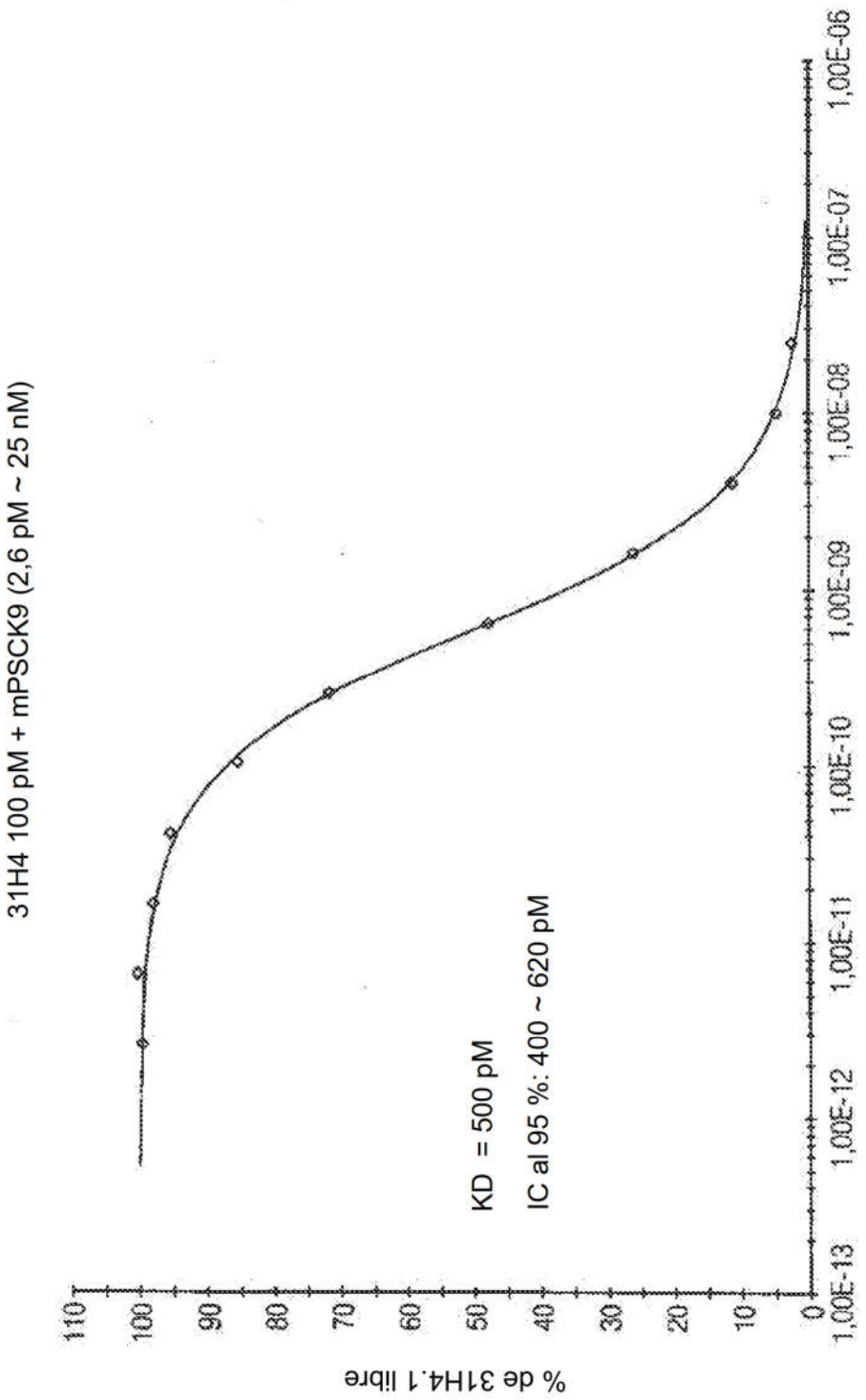

31H4 100 pM + mPSCK9 (2,6 pM ~ 25 nM)
KD = 500 pM
IC al 95 %: 400 ~ 620 pM
% de 31H4.1 libre
[mPCSK9] (M)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1,00E-13
1,00E-12
1,00E-11
1,00E-10
1,00E-09
1,00E-08
1,00E-07
1,00E-06

FIG. 4F

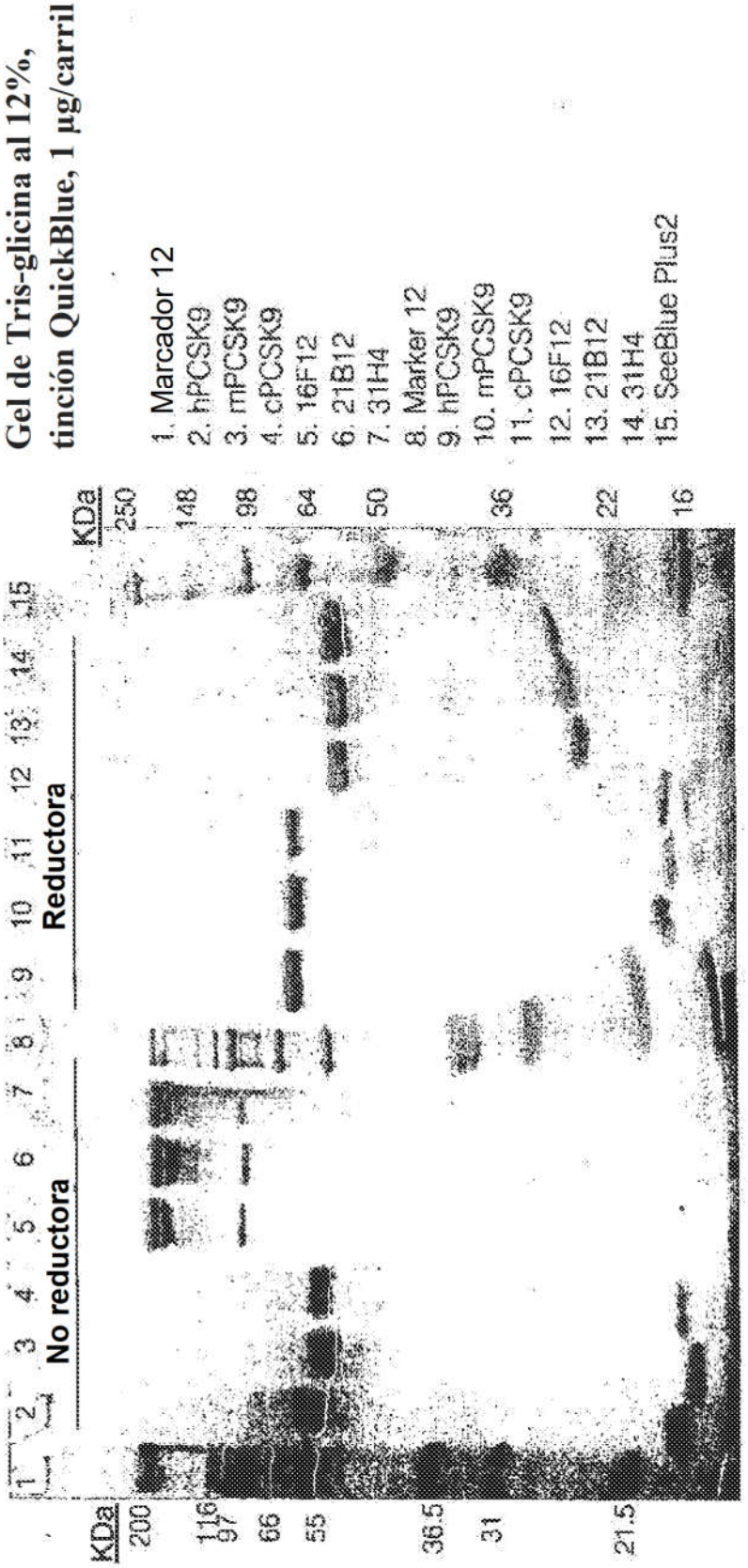

Gel de Tris-glicina al 12%, tinción QuickBlue, 1 µg/carril
1. Marcador 12
2. hPCSK9
3. mPCSK9
4. cPCSK9
5. 16F12
6. 21B12
7. 31H4
8. Marker 12
9. hPCSK9
10. mPCSK9
11. cPCSK9
12. 16F12
13. 21B12
14. 31H4
15. SeeBlue Plus2
No reductora
Reductora
KDa
200
116
97
66
55
36.5
31
21.5
KDa
250
148
98
64
50
36
22
16

FIG. 5A

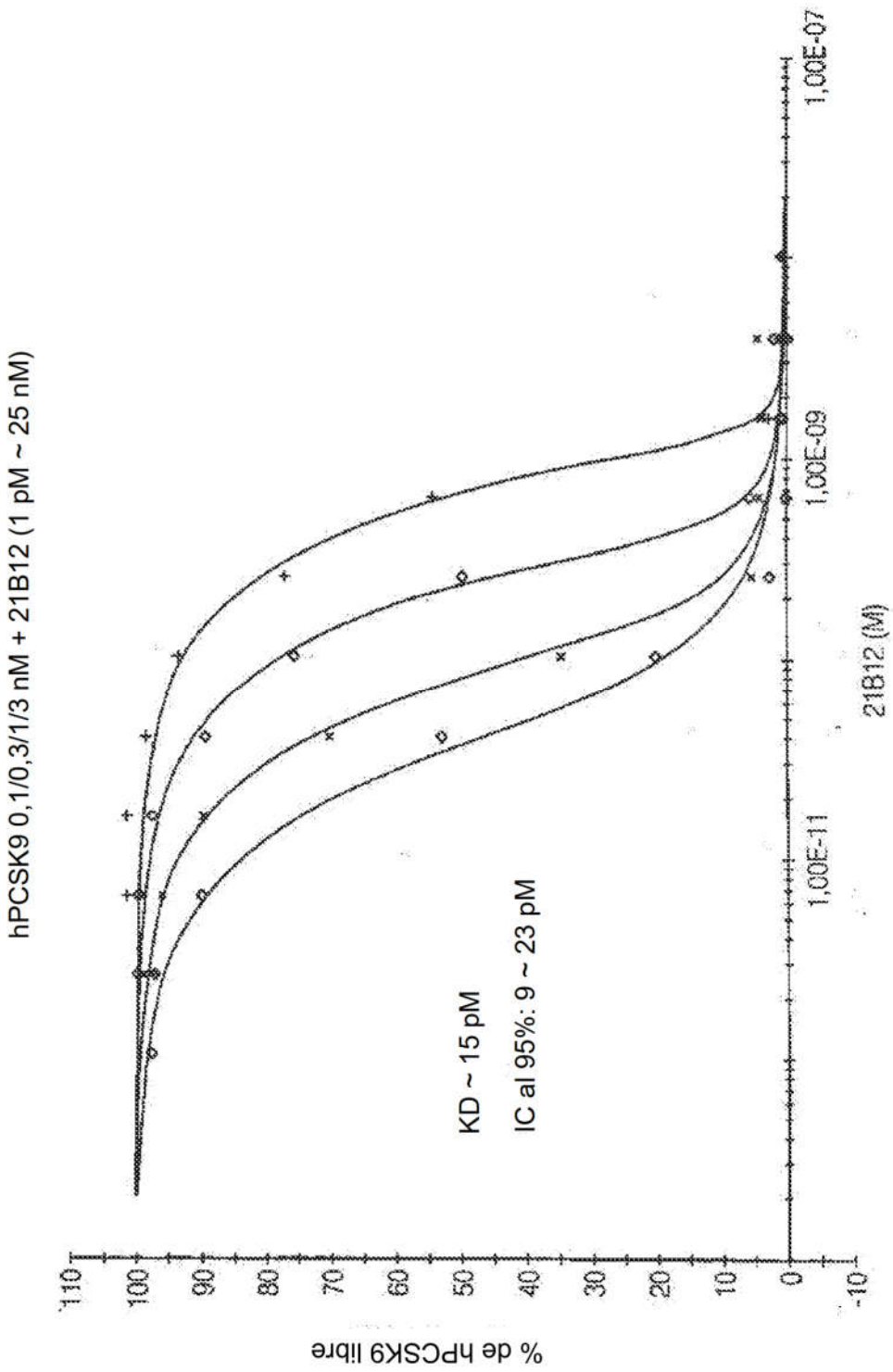

hPCSK9 0,1/0,3/1/3 nM + 21B12 (1 pM ~ 25 nM)
KD ~ 15 pM
IC al 95%: 9 ~ 23 pM
% de hPCSK9 libre
21B12 (M)
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
1,00E-11
1,00E-09
1,00E-07

FIG. 5B

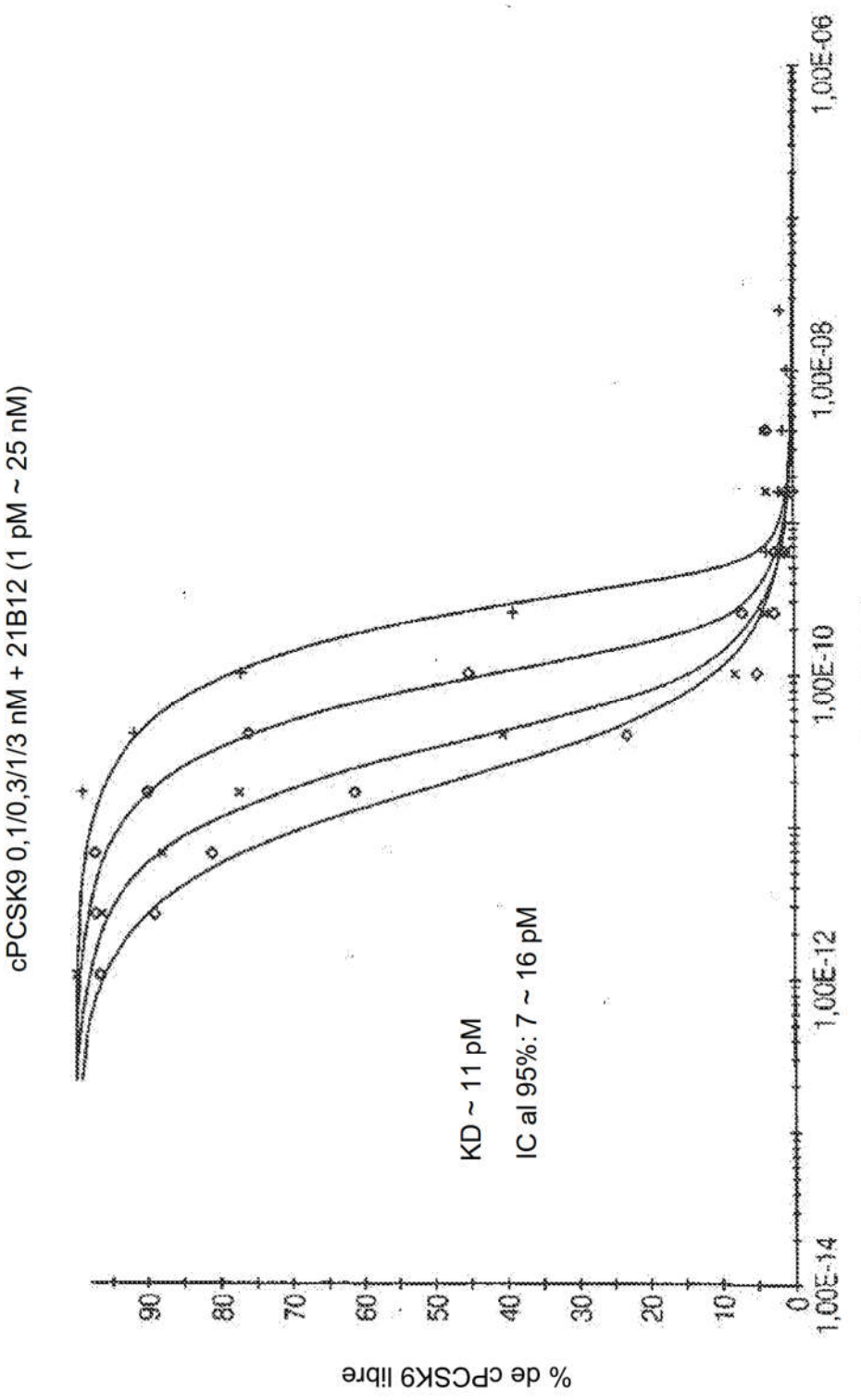

cPCSK9 0,1/0,3/1/3 nM + 21B12 (1 pM ~ 25 nM)
KD ~ 11 pM
IC al 95%: 7 ~ 16 pM
% de cPCSK9 libre
[21B12] (M)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
1,00E-14
1,00E-12
1,00E-10
1,00E-08
1,00E-06

FIG. 5C

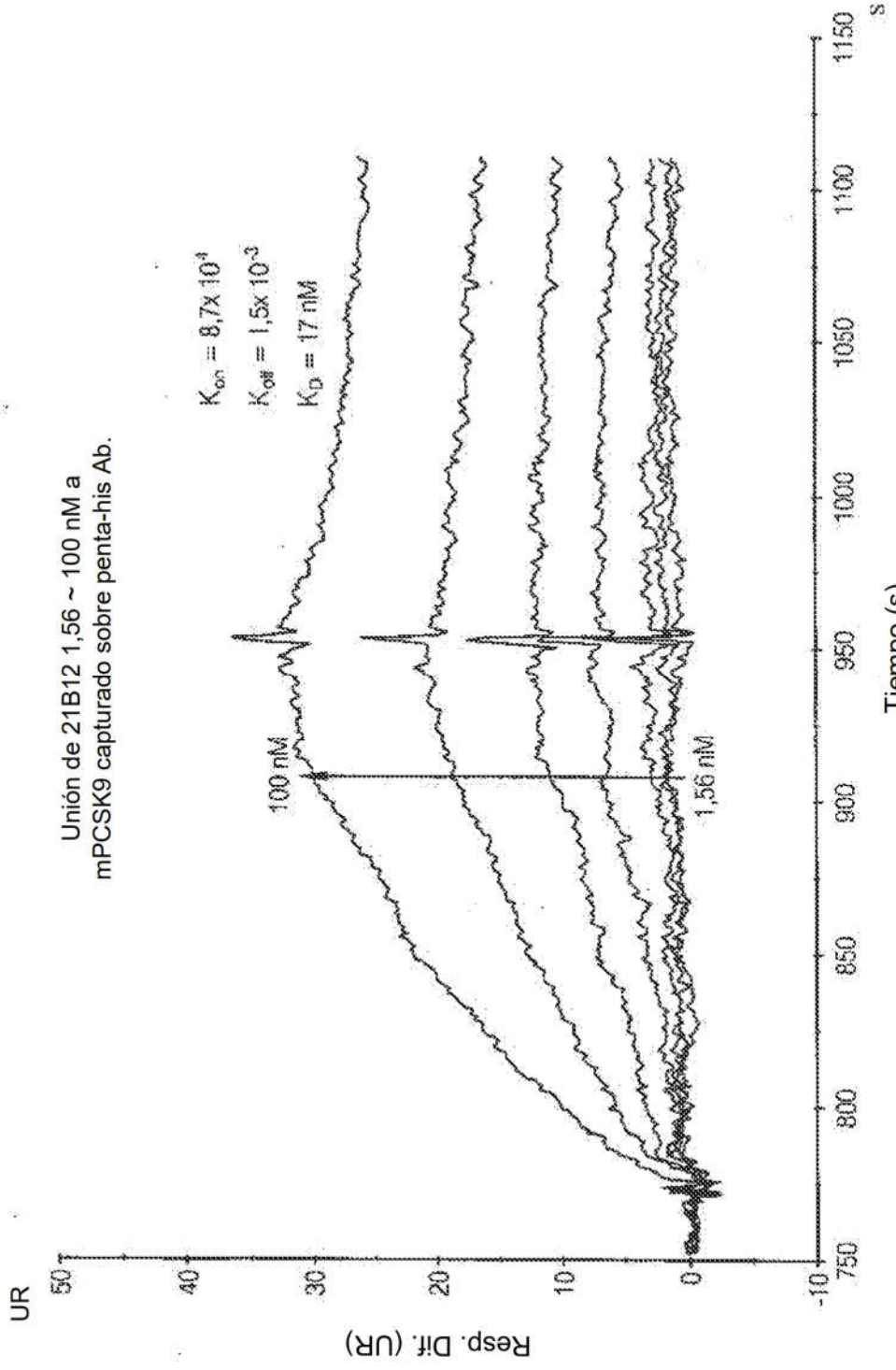

Unión de 21B12 1,56 ~ 100 nM a
mPCSK9 capturado sobre penta-his Ab.
K_{on} = 8,7x 10^{4}
K_{off} = 1,5x 10^{-3}
K_D = 17 nM
100 nM
1,56 nM
UR
Resp. Dif. (UR)
Tiempo (s)
s

FIG. 5D

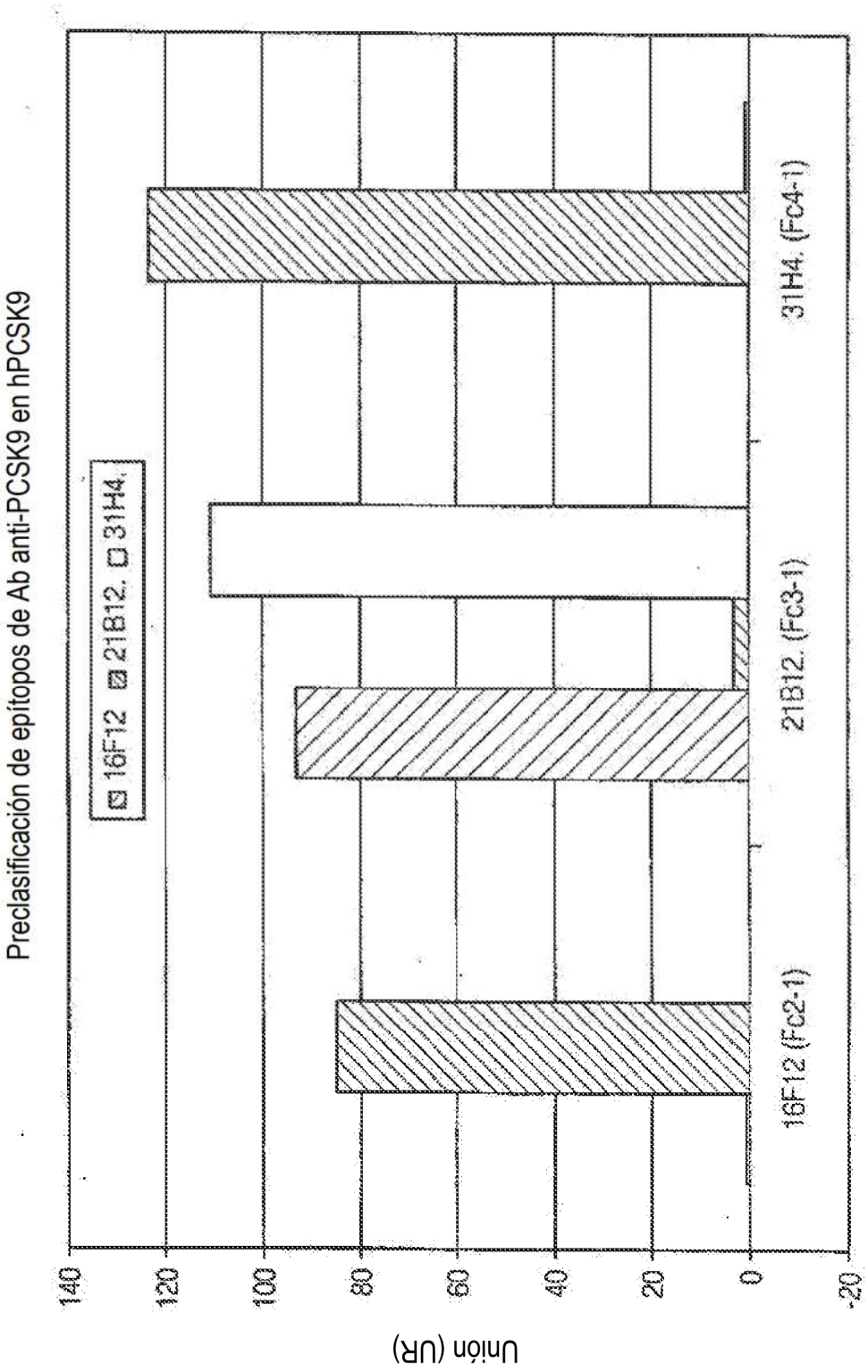

Preclasificación de epítopos de Ab anti-PCSK9 en hPCSK9
16F12
21B12.
31H4.
Unión (UR)
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
16F12 (Fc2-1)
21B12. (Fc3-1)
31H4. (Fc4-1)

FIG. 5E

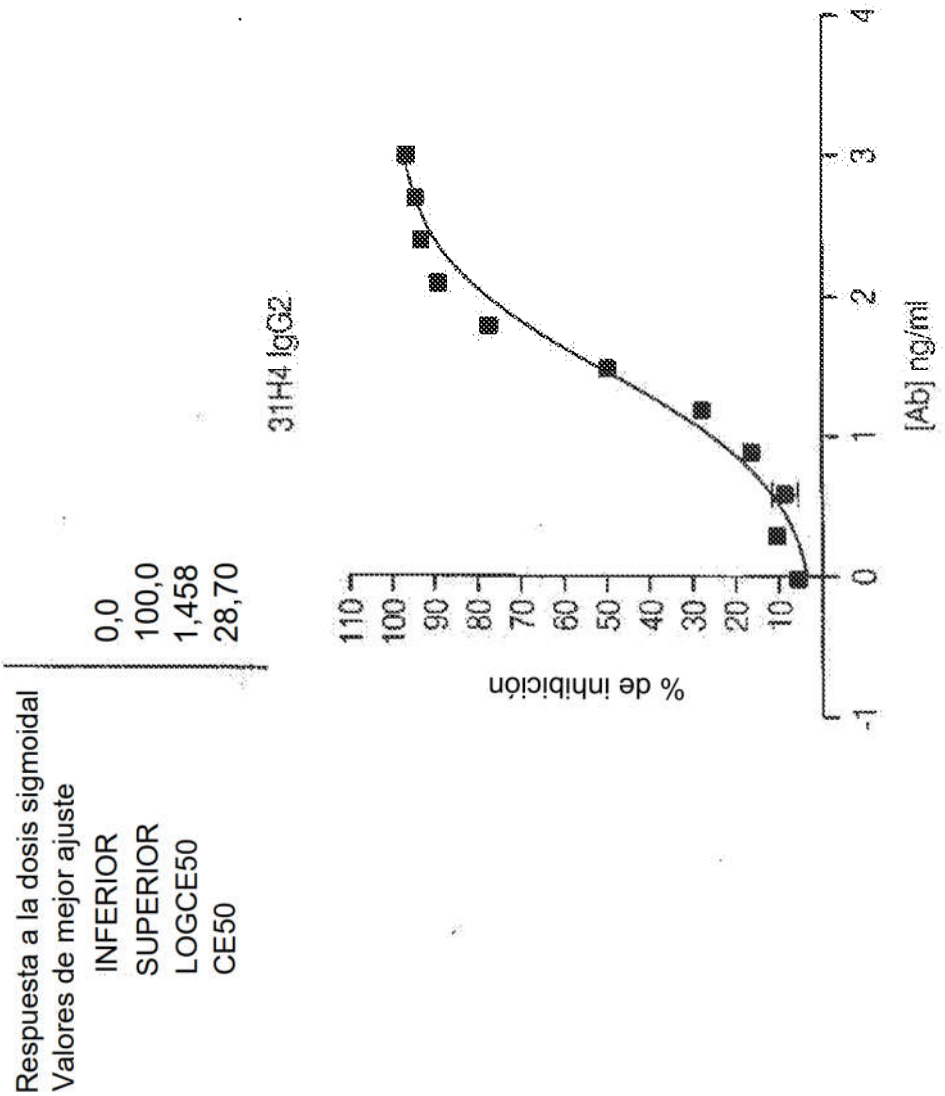

Respuesta a la dosis sigmoidal
Valores de mejor ajuste
INFERIOR 0,0
SUPERIOR 100,0
LOGCE50 1,458
CE50 28,70
31H4 IgG2
% de inhibición
[Ab] ng/ml
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
-1
0
1
2
3
4

FIG. 6A

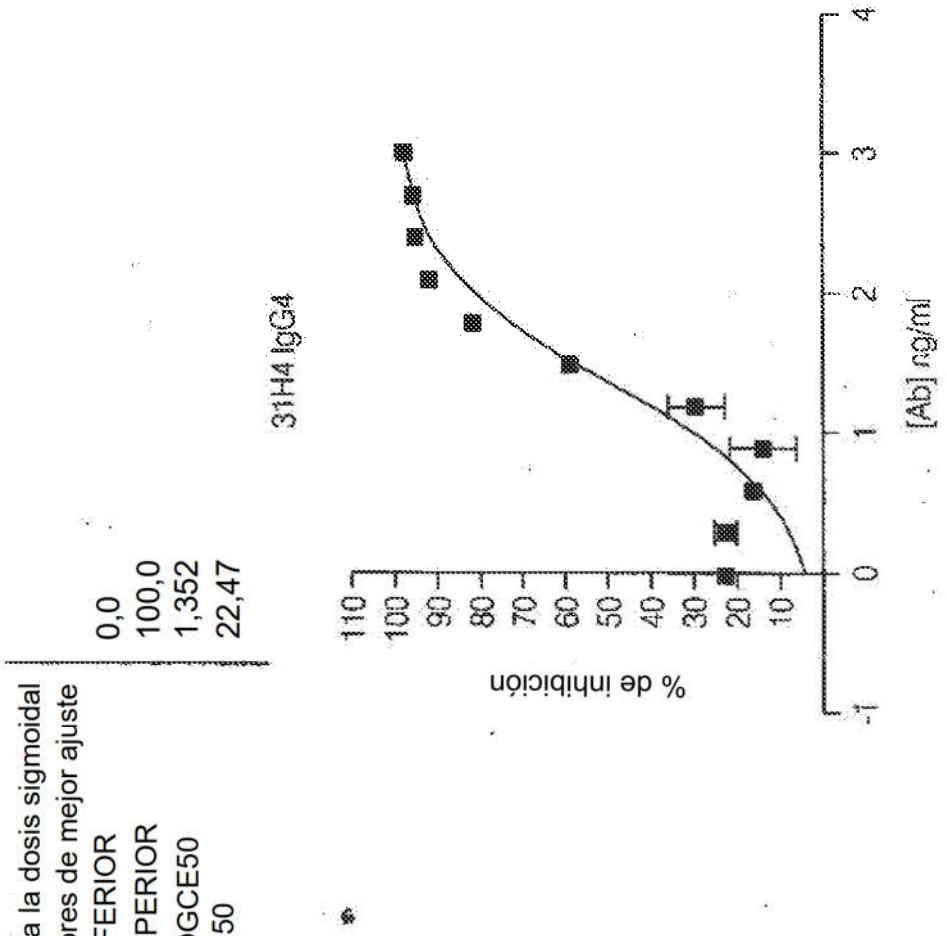

Respuesta a la dosis sigmoidal
Valores de mejor ajuste
INFERIOR 0,0
SUPERIOR 100,0
LOGCE50 1,352
CE50 22,47
31H4 IgG4
% de inhibición
[Ab] ng/ml
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
-1
0
1
2
3
4

FIG. 6B

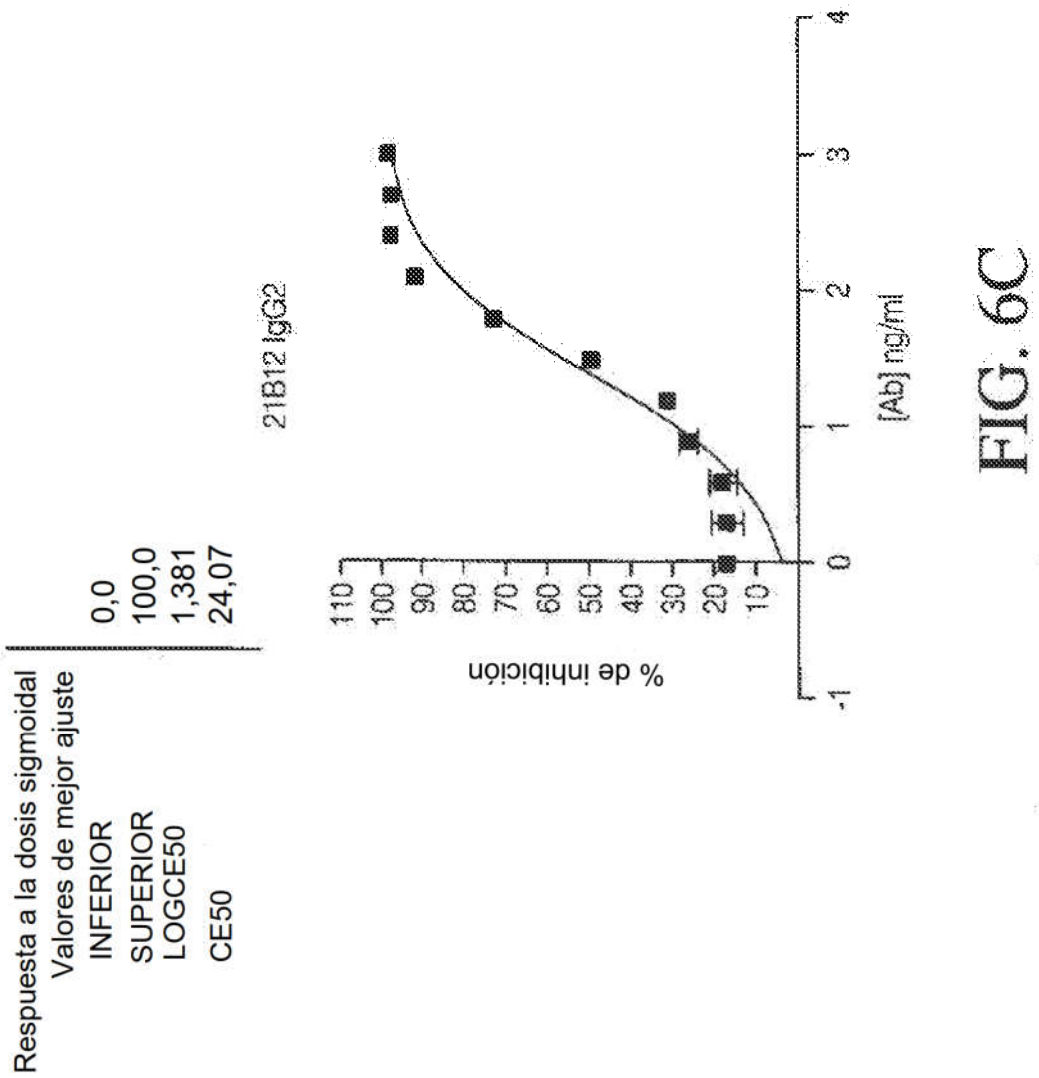

Respuesta a la dosis sigmoidal
Valores de mejor ajuste
INFERIOR 0,0
SUPERIOR 100,0
LOGCE50 1,381
CE50 24,07
21B12 IgG2
% de inhibición
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
-1
0
1
2
3
4
[Ab] ng/ml

FIG. 6C

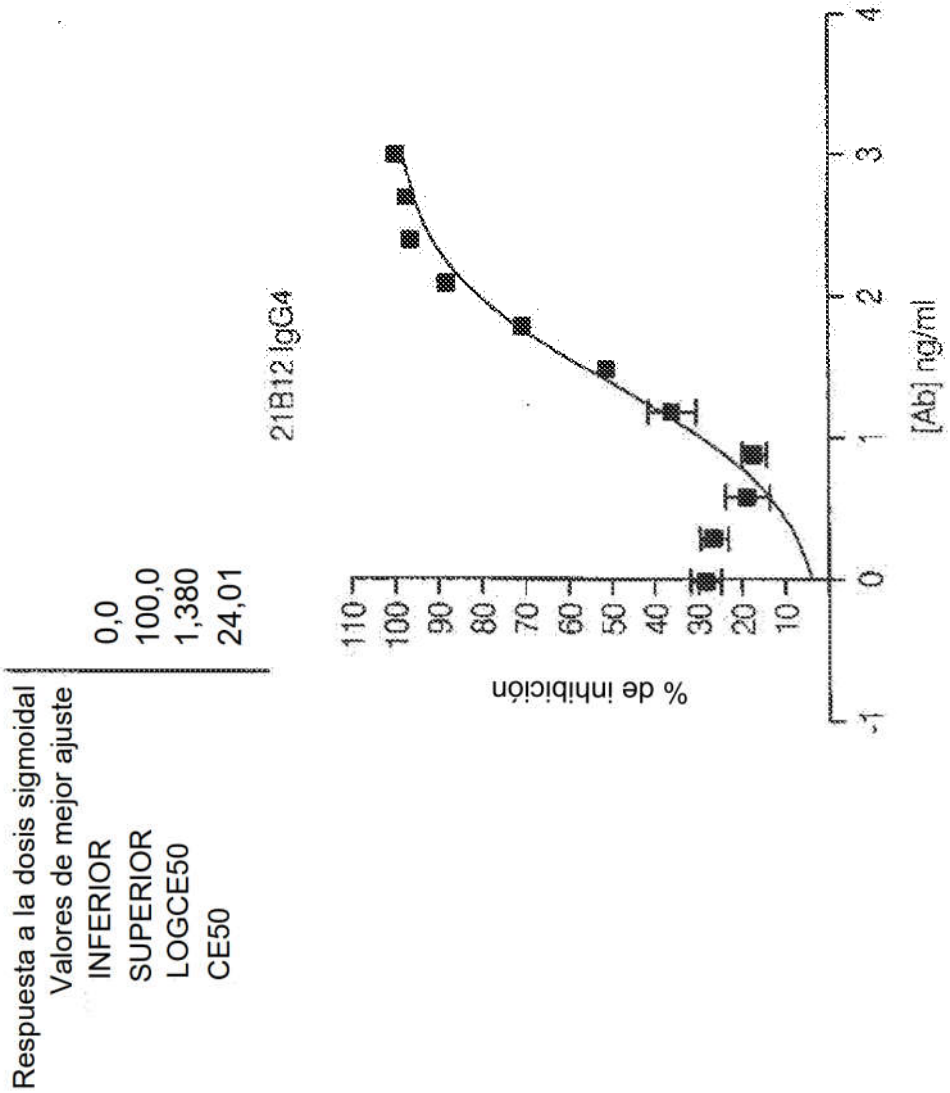

Respuesta a la dosis sigmoidal
Valores de mejor ajuste
INFERIOR 0,0
SUPERIOR 100,0
LOGCE50 1,380
CE50 24,01
21B12 IgG4
% de inhibición
[Ab] ng/ml

FIG. 6D

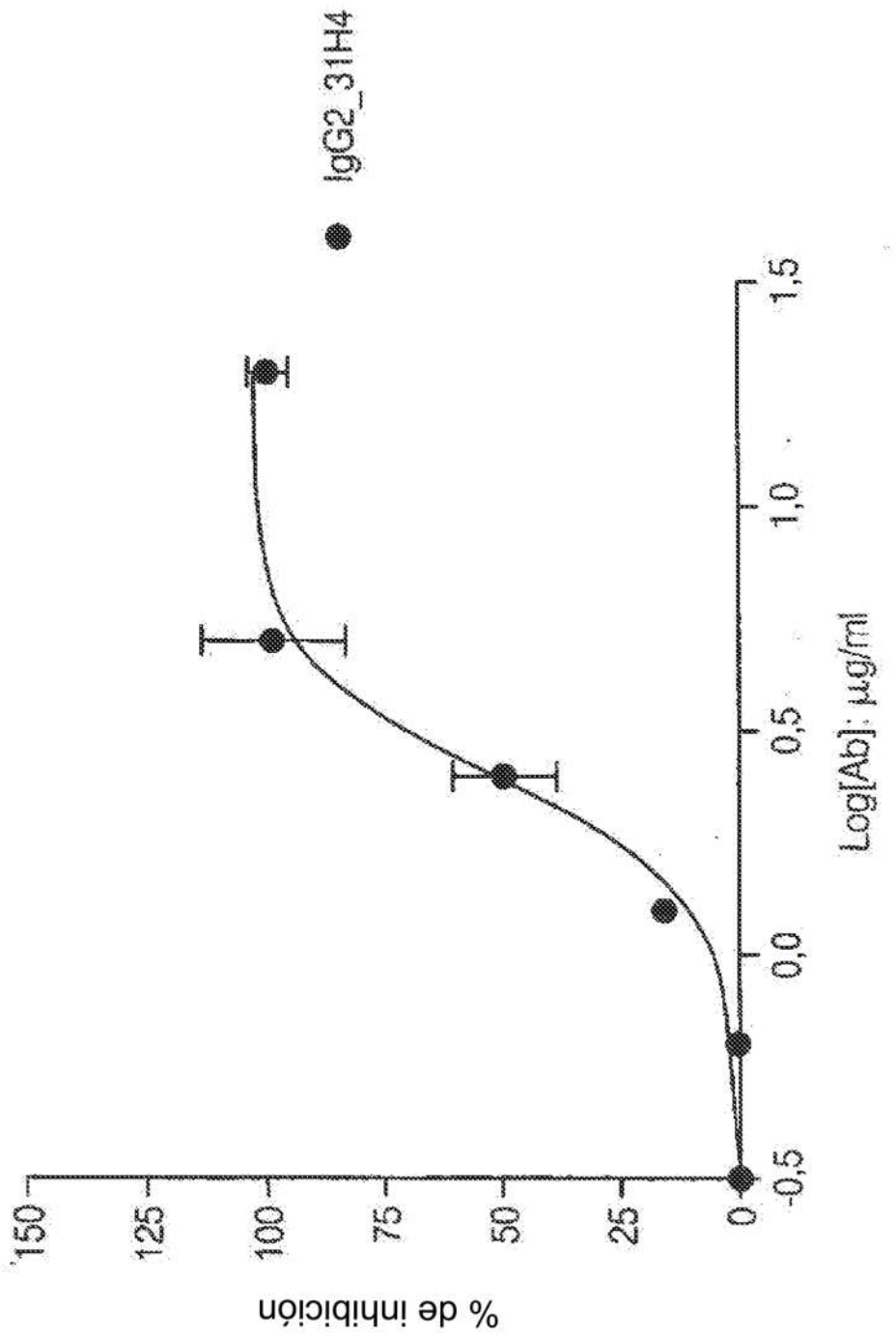

IgG2_31H4
% de inhibición
150
125
100
75
50
25
0
-0,5
0,0
0,5
1,0
1,5
Log[Ab]: µg/ml

FIG. 7A

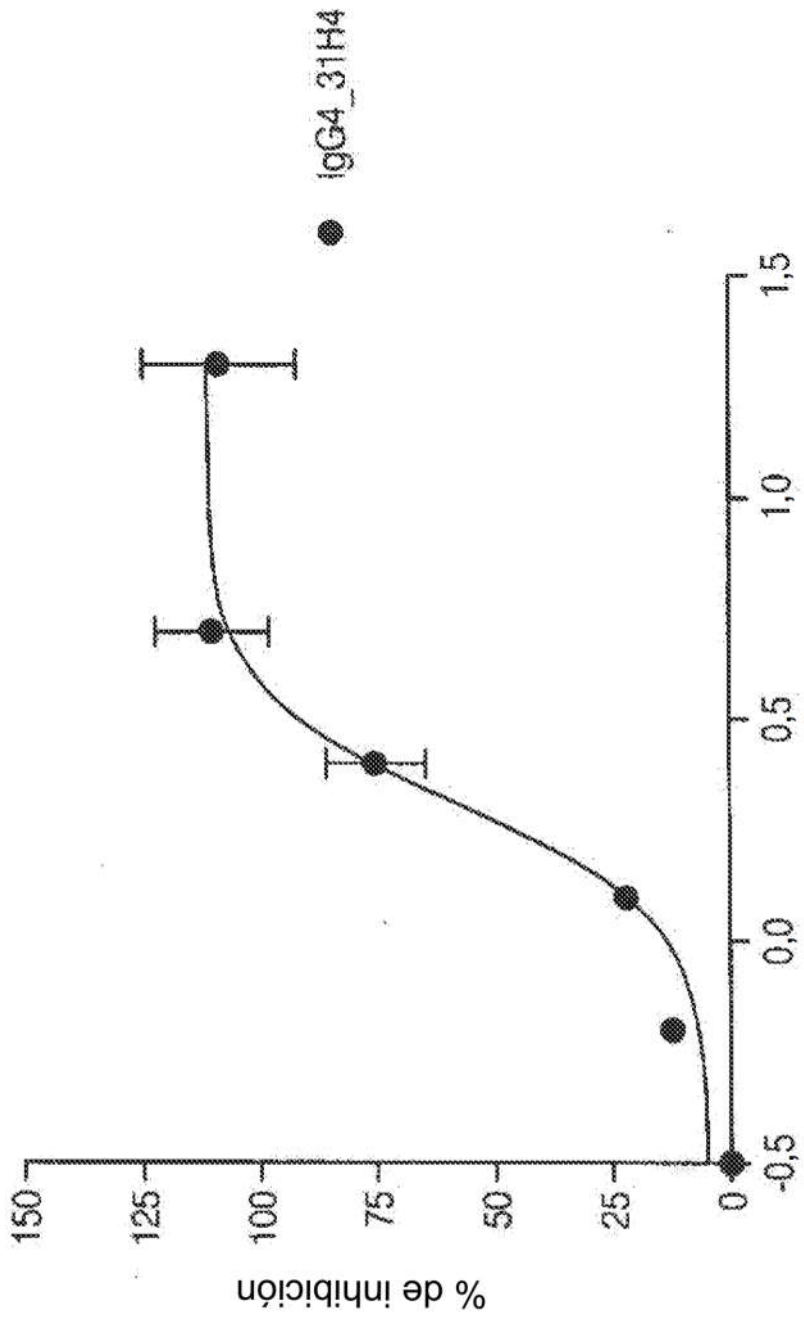

IgG4_31H4
% de inhibición
150
125
100
75
50
25
0
-0,5
0,0
0,5
1,0
1,5
Log[Ab]: µg/ml

FIG. 7B

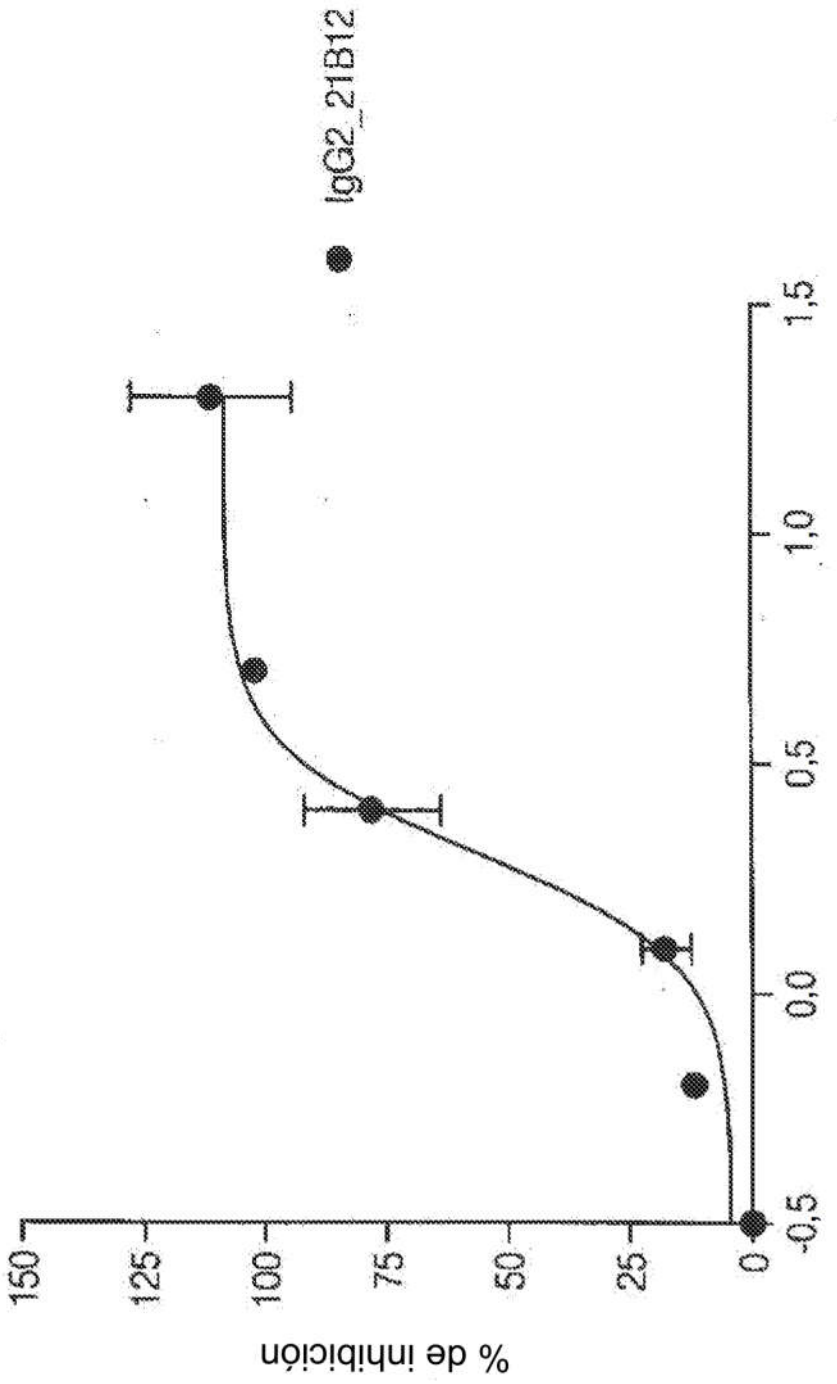

IgG2_21B12
% de inhibición
150
125
100
75
50
25
0
-0,5
0,0
0,5
1,0
1,5
Log[Ab]: µg/ml

FIG. 7C

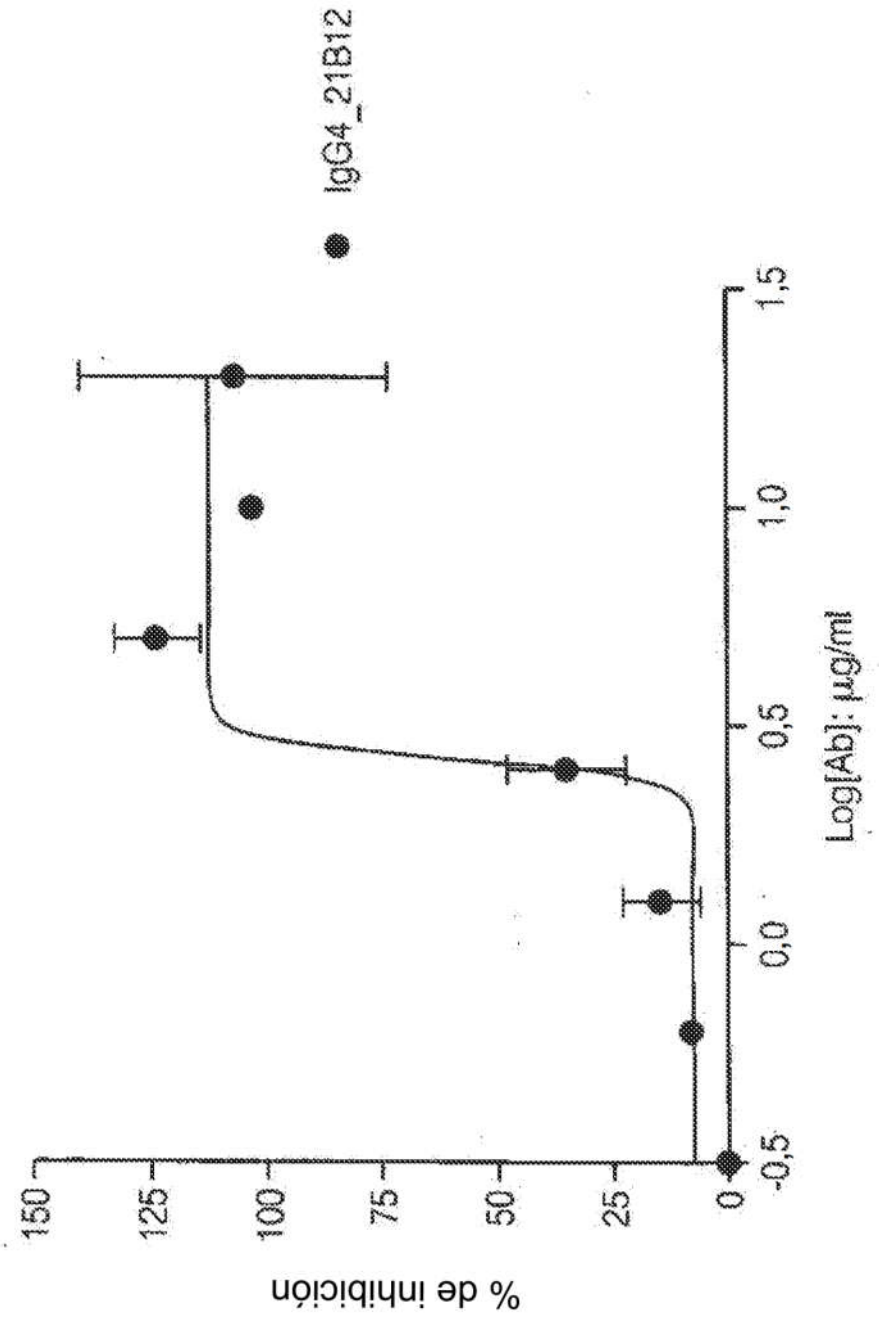

IgG4_21B12
% de inhibición
150
125
100
75
50
25
0
-0,5
0,0
0,5
1,0
1,5
Log[Ab]: µg/ml

FIG. 7D

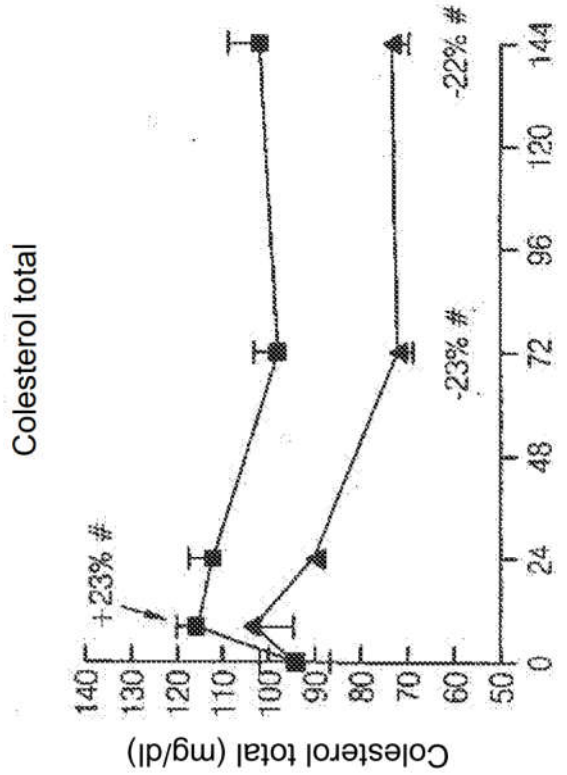

Colesterol total
+23% #
-23% #
-22% #
Colesterol total (mg/dl)
Tiempo (h)
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
0
24
48
72
96
120
144

FIG. 8B

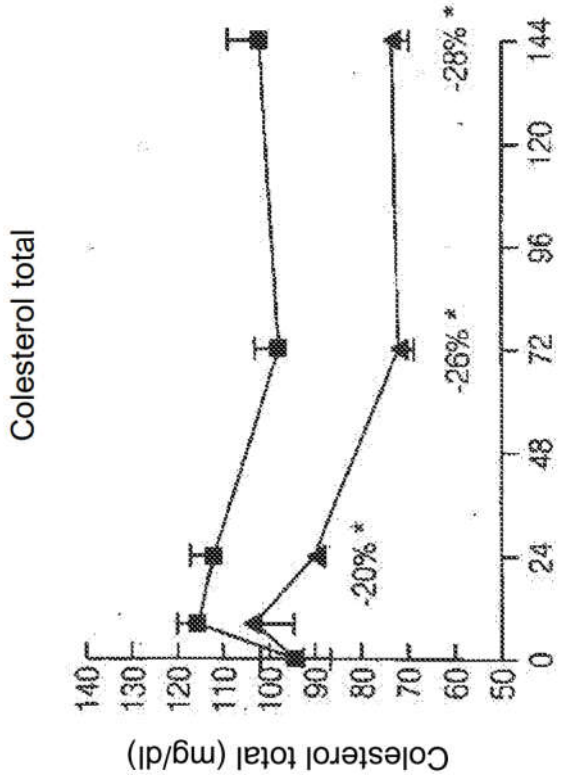

Colesterol total
-20% *
-26% *
-28% *
Colesterol total (mg/dl)
Tiempo (h)
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
0
24
48
72
96
120
144

FIG. 8A

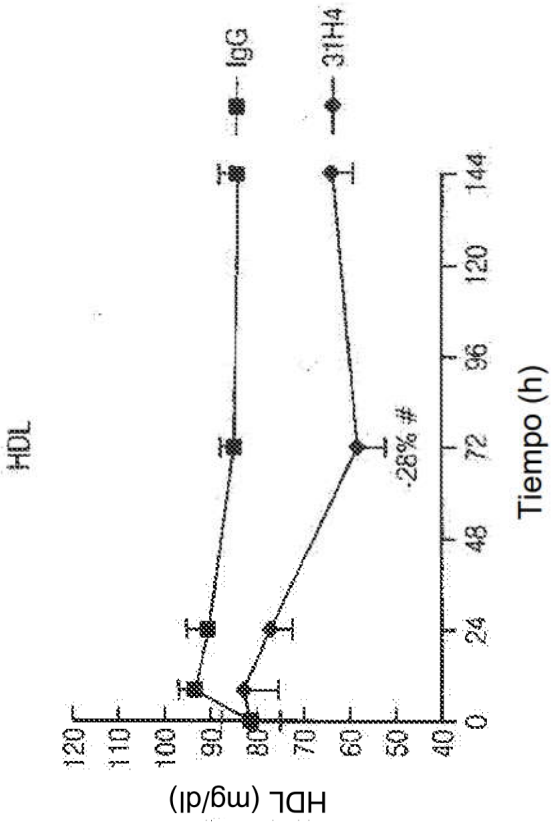

HDL
IgG
31H4
-28% #
HDL (mg/dl)
Tiempo (h)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
0
24
48
72
96
120
144

FIG. 8D

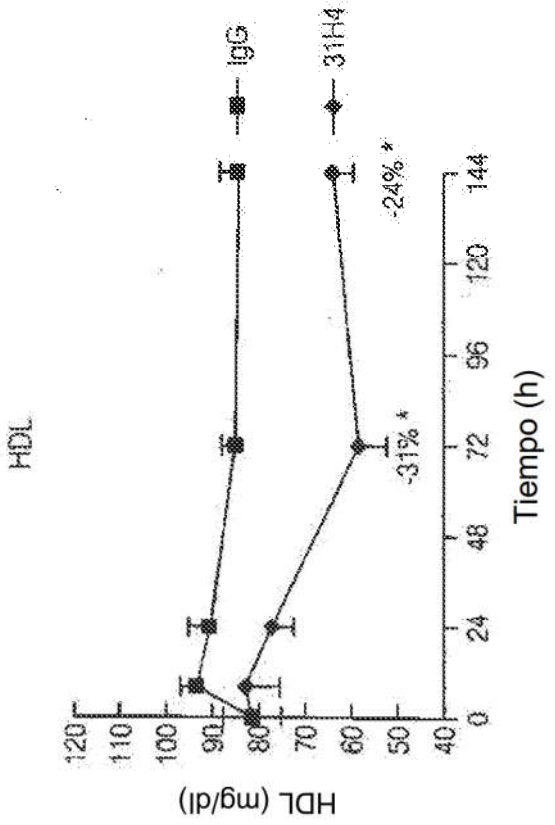

HDL
IgG
31H4
-24% *
-31% *
HDL (mg/dl)
Tiempo (h)
120
110
100
90
80
70
60
50
40
0
24
48
72
96
120
144

FIG. 8C

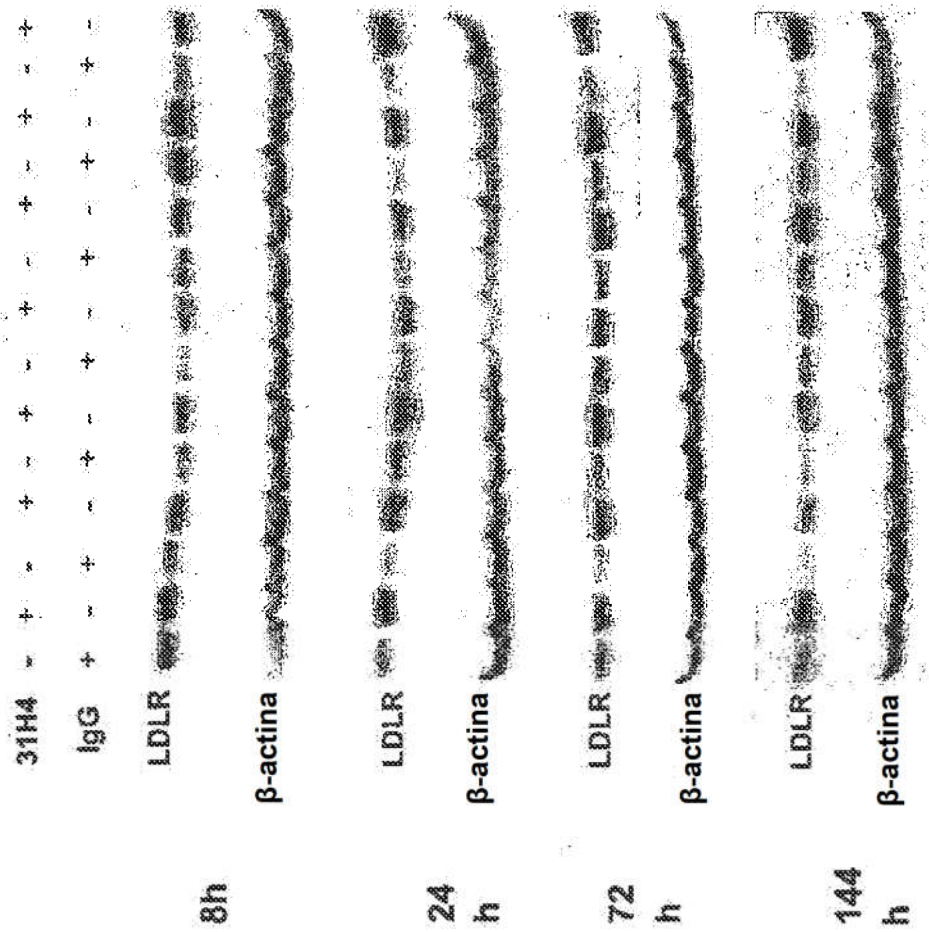


FIG. 9

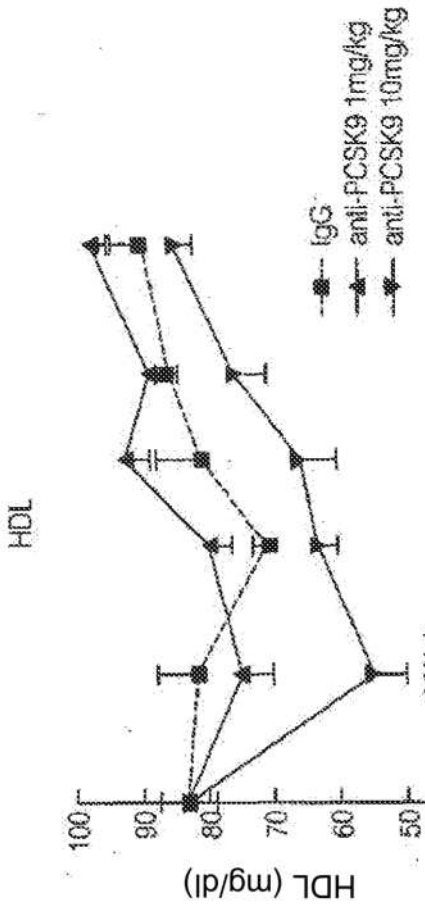


FIG. 10B

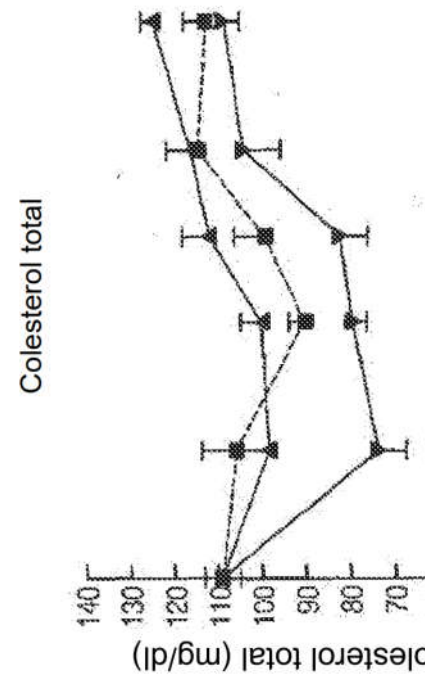


FIG. 10A

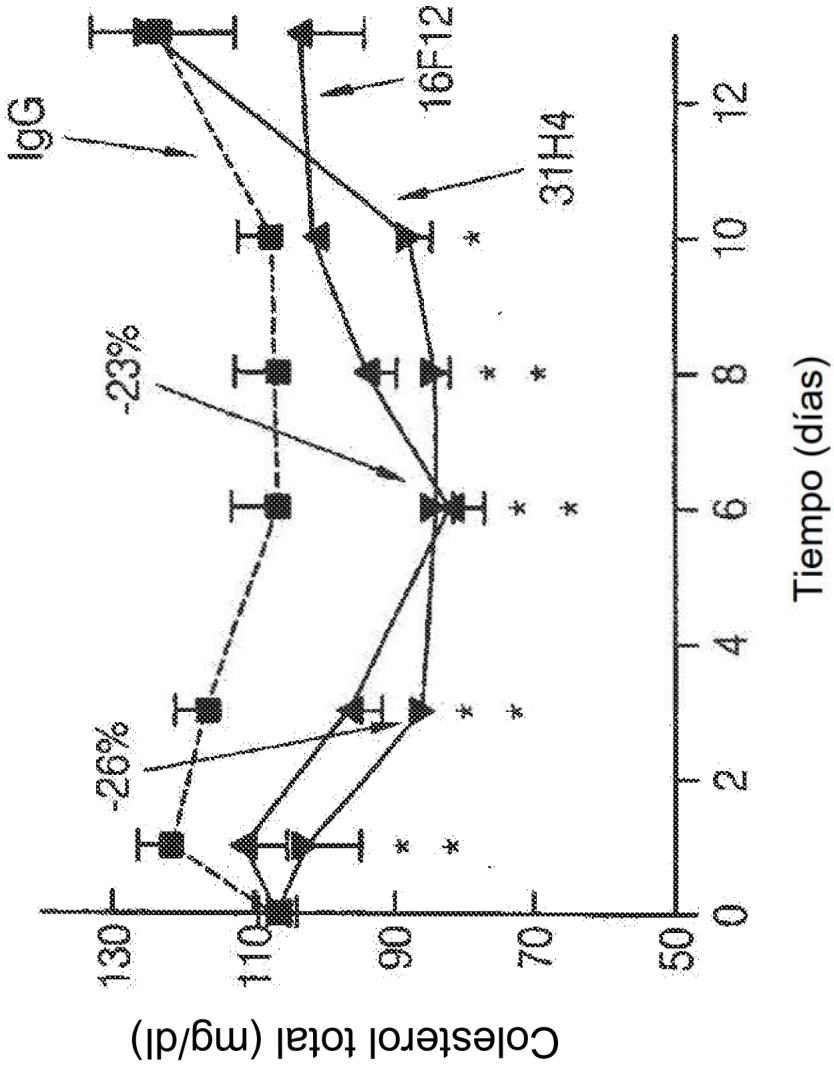

IgG
16F12
31H4
-23%
-26%
Colesterol total (mg/dl)
130
110
90
70
50
0
2
4
6
8
10
12
Tiempo (días)

FIG. 10C

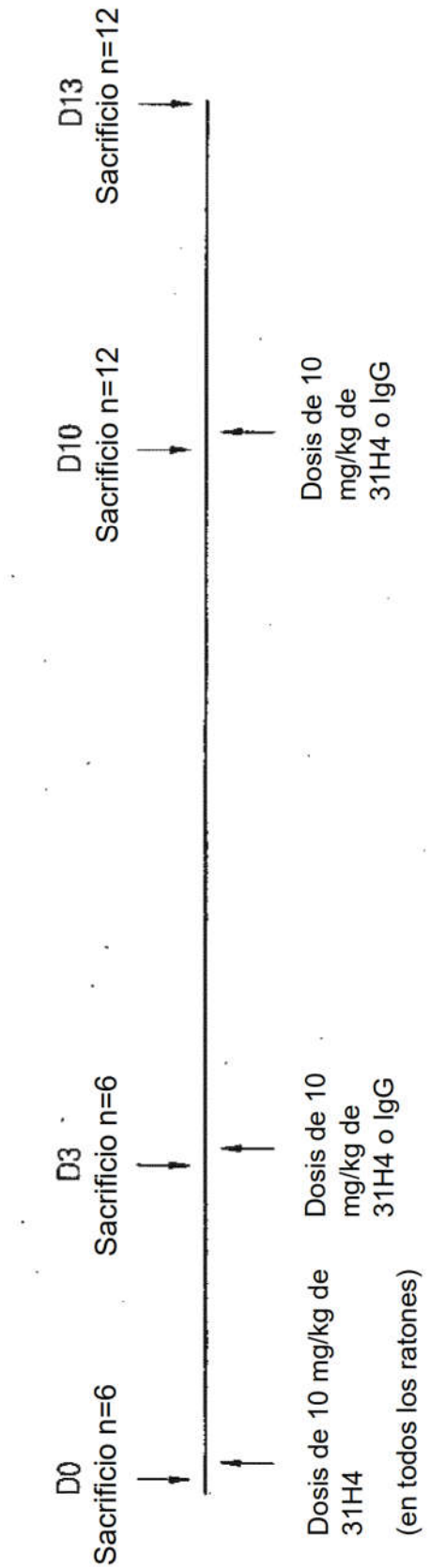

D0
Sacrificio n=6
D3
Sacrificio n=6
D10
Sacrificio n=12
D13
Sacrificio n=12
Dosis de 10 mg/kg de 31H4
(en todos los ratones)
Dosis de 10 mg/kg de 31H4 o IgG
Dosis de 10 mg/kg de 31H4 o IgG

FIG. 11A

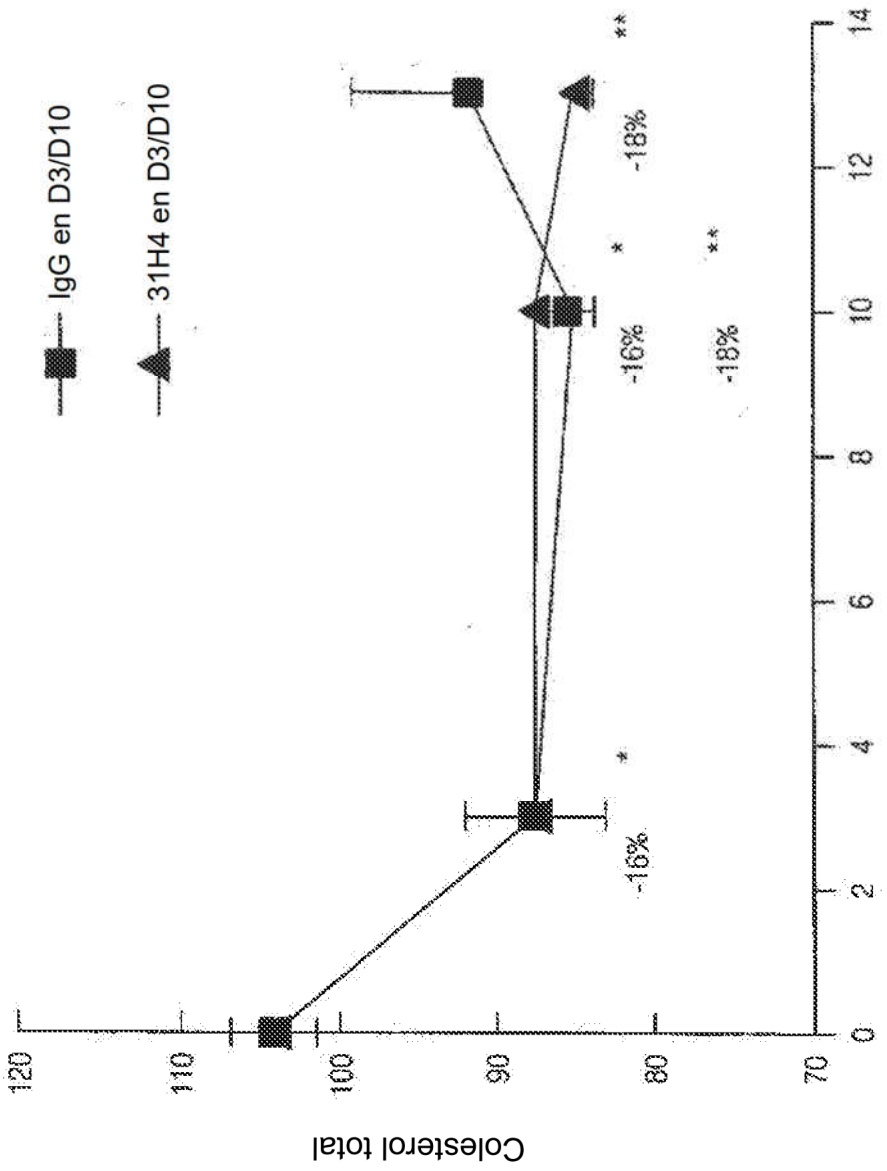

IgG en D3/D10
31H4 en D3/D10
Colesterol total
Tiempo (días)
120
110
100
90
80
70
0
2
4
6
8
10
12
14
-16%
-16%
-18%
-18%
*
*
**
**

FIG. 11B

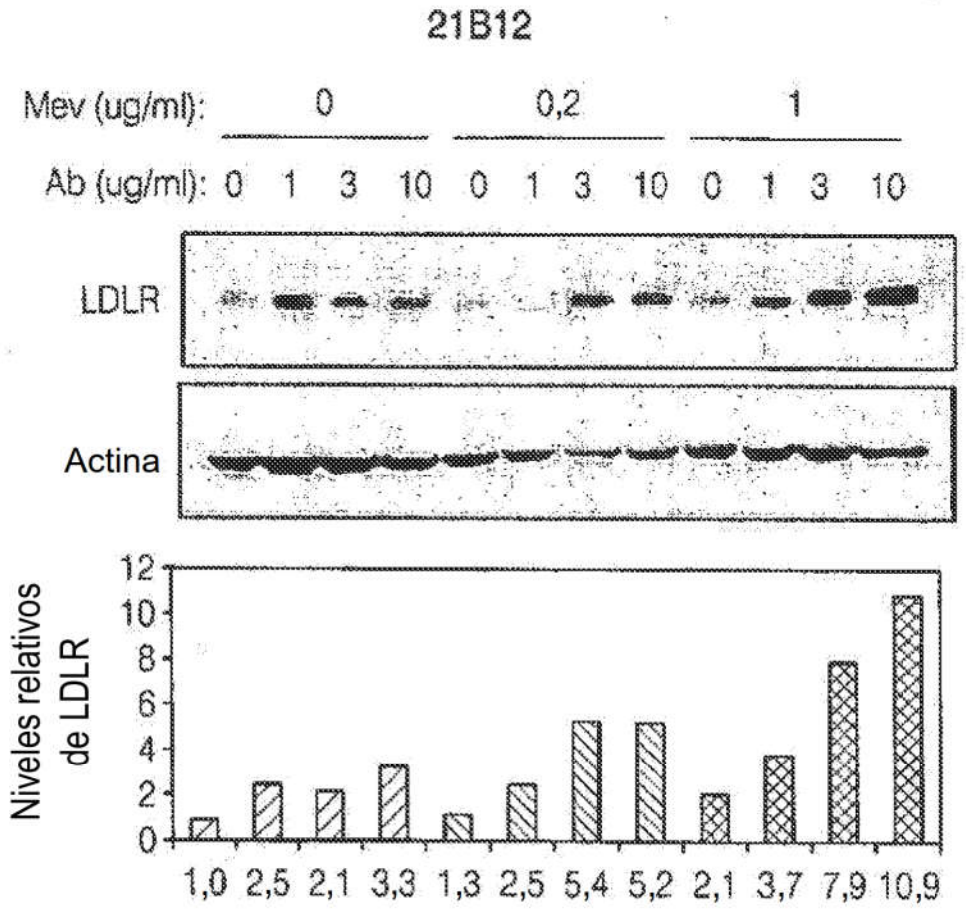

21B12
Mev (ug/ml): 0 0,2 1
Ab (ug/ml): 0 1 3 10 0 1 3 10 0 1 3 10
LDLR
Actina
Niveles relativos de LDLR
12
10
8
6
4
2
0
1,0 2,5 2,1 3,3 1,3 2,5 5,4 5,2 2,1 3,7 7,9 10,9

FIG. 12A

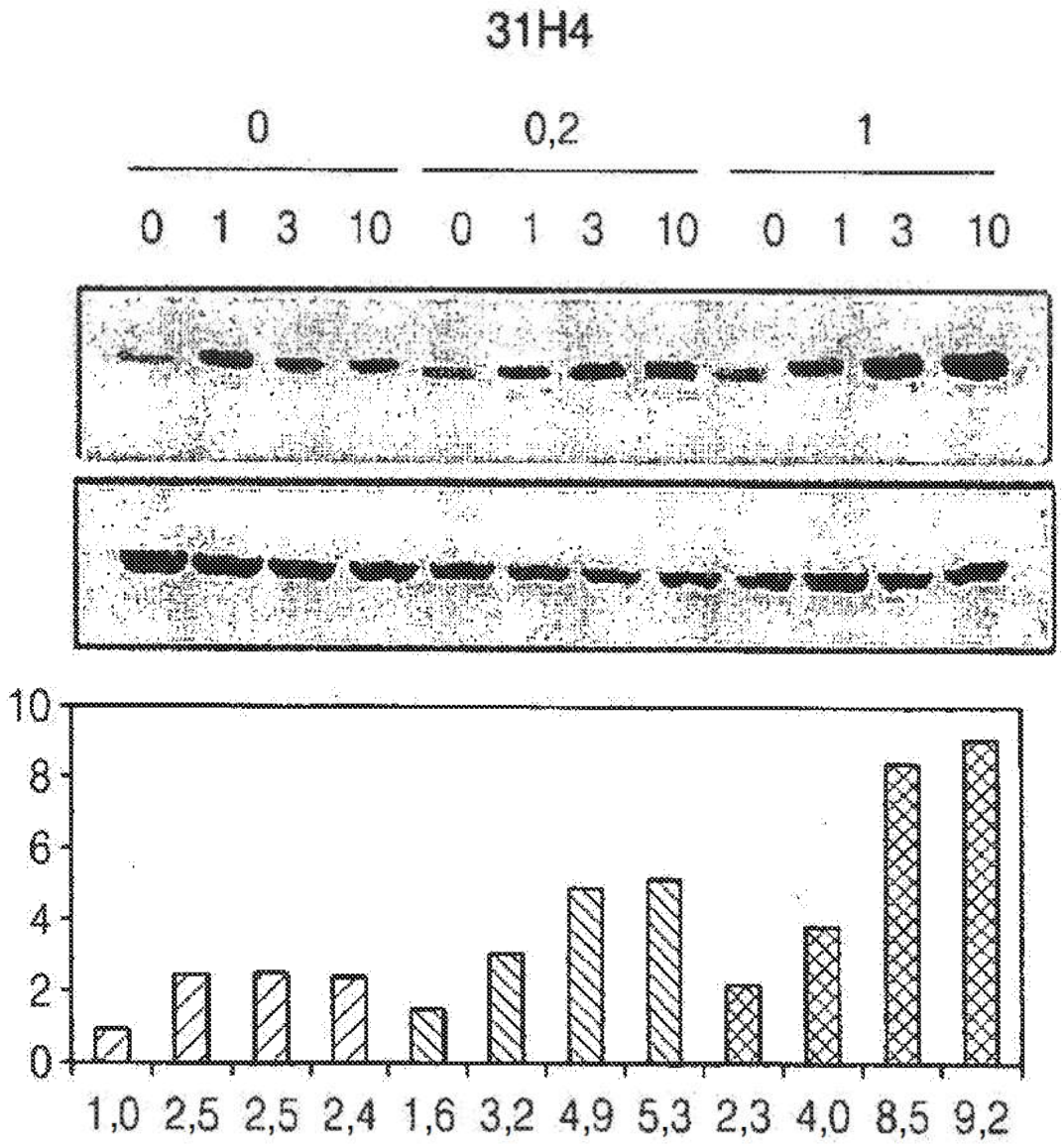

31H4
0
0,2
1
0 1 3 10 0 1 3 10 0 1 3 10
10
8
6
4
2
0
1,0 2,5 2,5 2,4 1,6 3,2 4,9 5,3 2,3 4,0 8,5 9,2

FIG. 12B

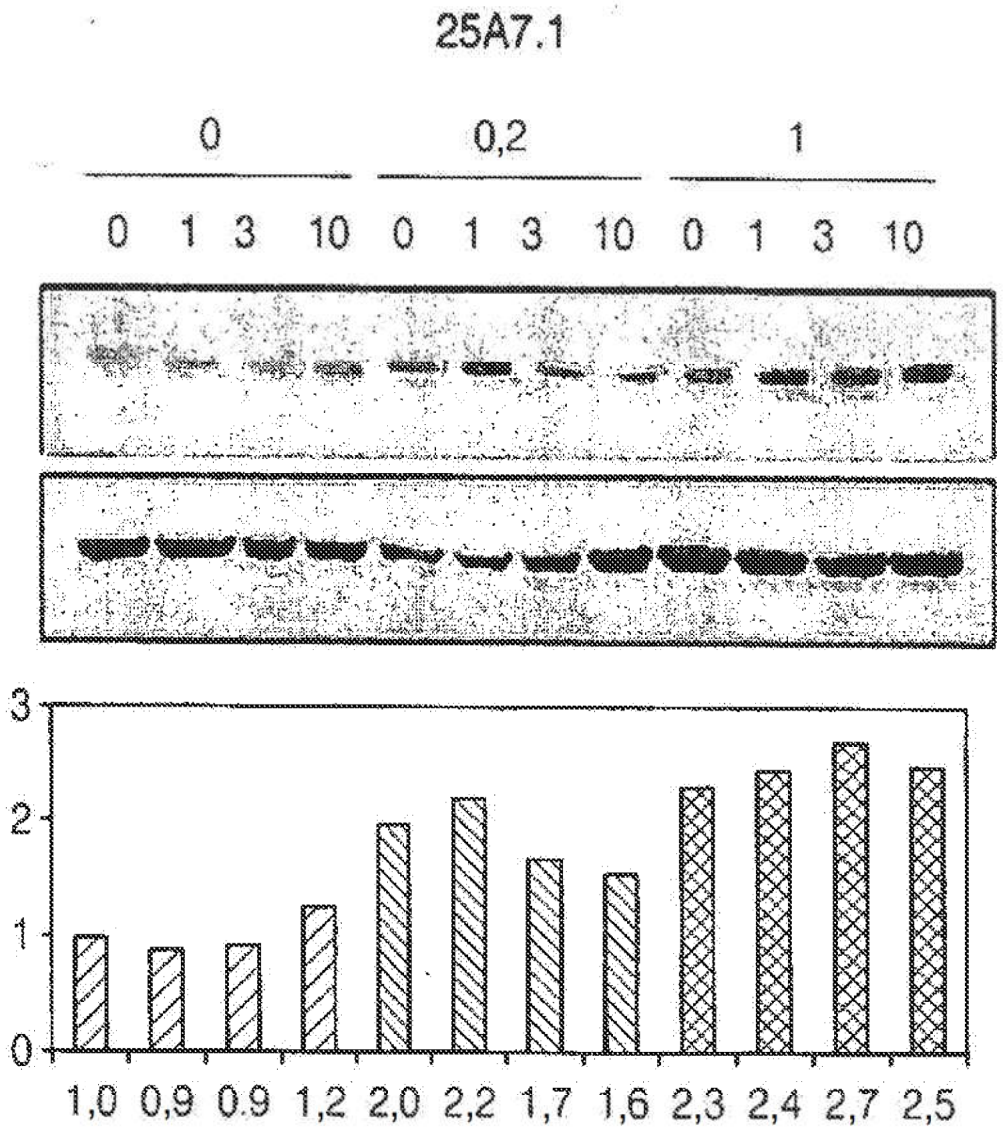

25A7.1
0
0,2
1
0 1 3 10 0 1 3 10 0 1 3 10
3
2
1
0
1,0 0,9 0.9 1,2 2,0 2,2 1,7 1,6 2,3 2,4 2,7 2,5

FIG. 12C

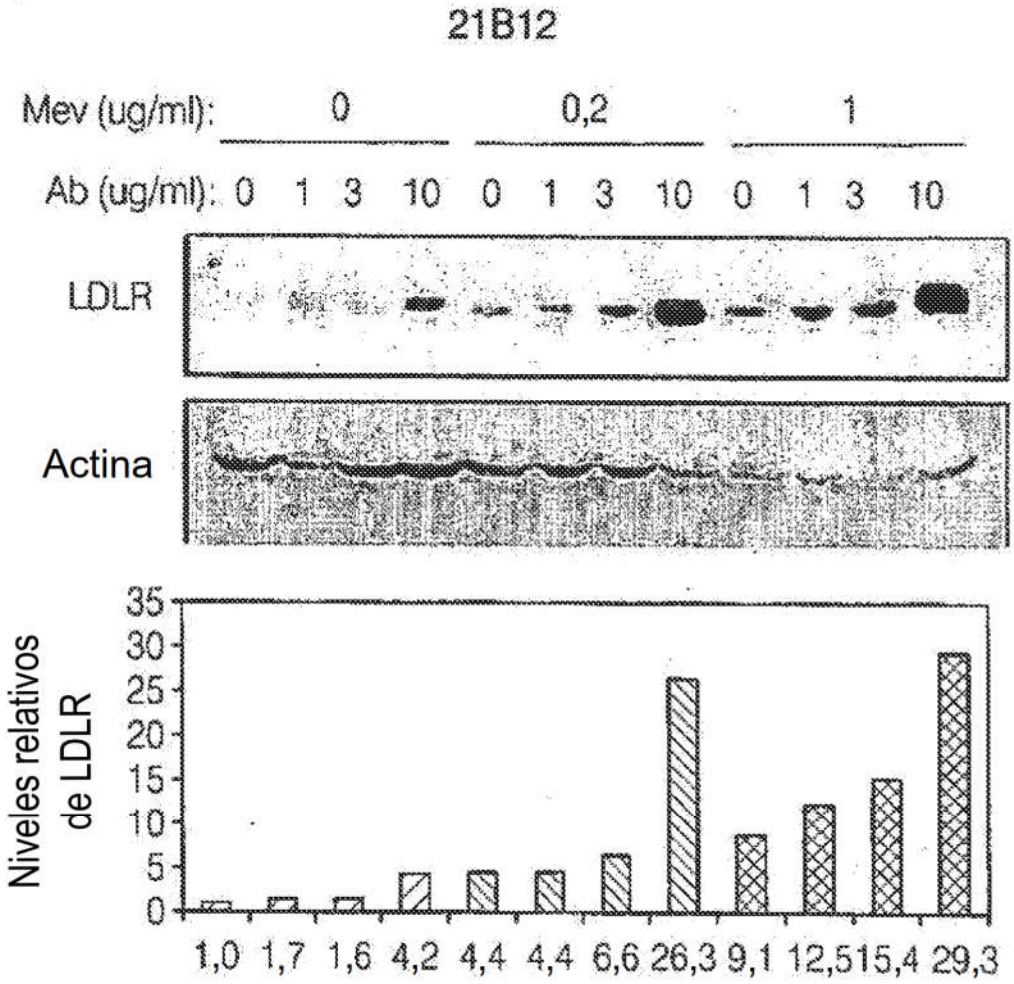

21B12
Mev (ug/ml): 0 0,2 1
Ab (ug/ml): 0 1 3 10 0 1 3 10 0 1 3 10
LDLR
Actina
Niveles relativos de LDLR
35
30
25
20
15
10
5
0
1,0 1,7 1,6 4,2 4,4 4,4 6,6 26,3 9,1 12,5 15,4 29,3

FIG. 12D

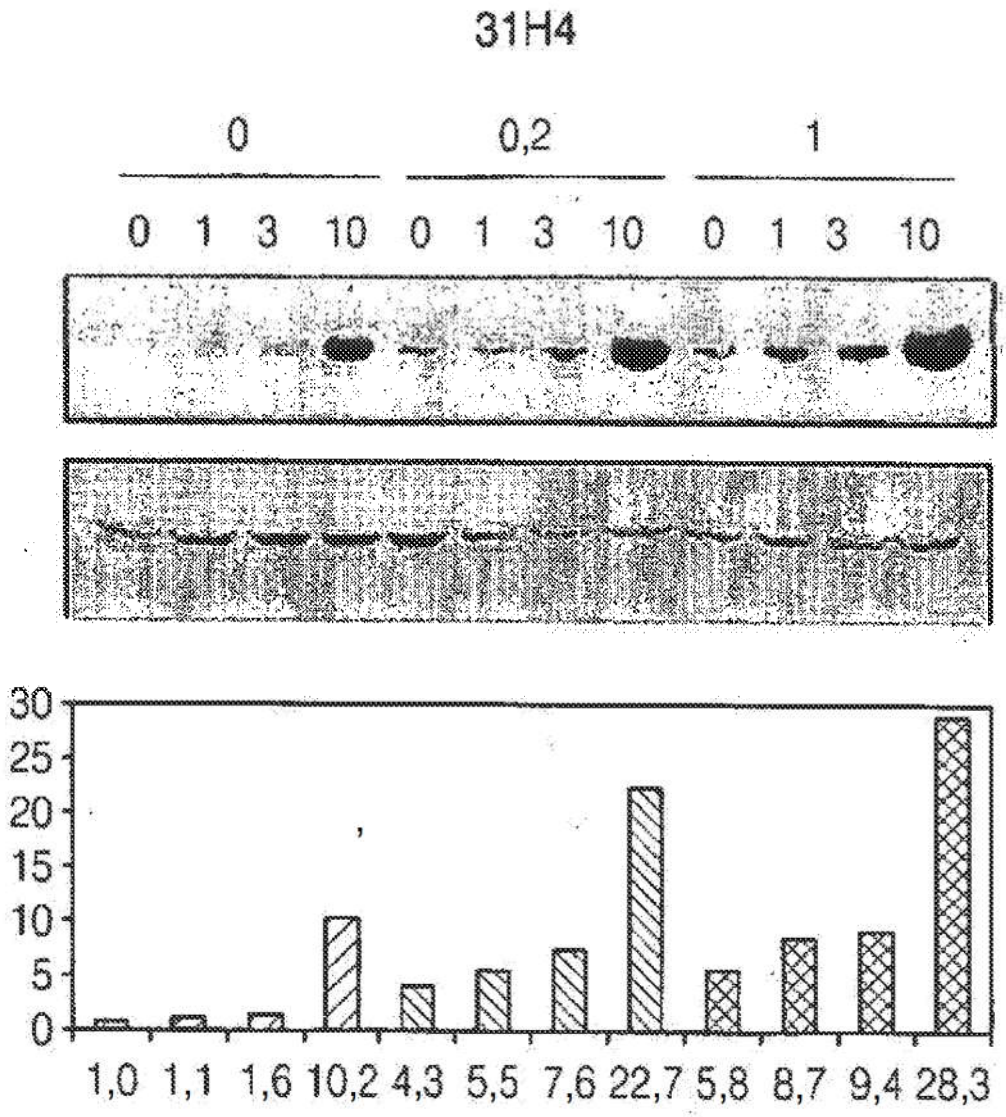

31H4
0
0,2
1
0 1 3 10 0 1 3 10 0 1 3 10
30
25
20
15
10
5
0
1,0 1,1 1,6 10,2 4,3 5,5 7,6 22,7 5,8 8,7 9,4 28,3

FIG. 12E

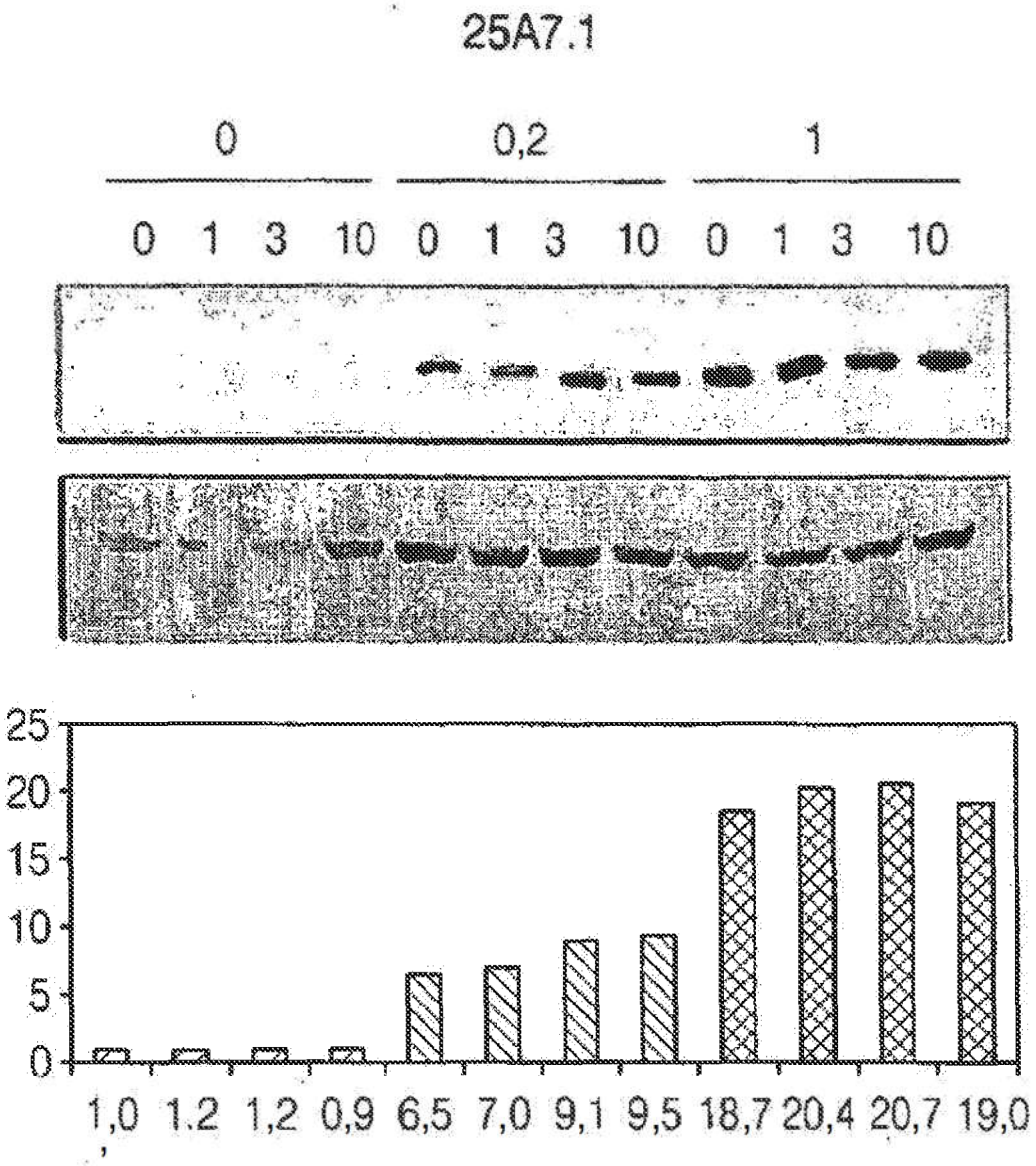

25A7.1
0
0,2
1
0 1 3 10 0 1 3 10 0 1 3 10
25
20
15
10
5
0
1,0 1.2 1,2 0,9 6,5 7,0 9,1 9,5 18,7 20,4 20,7 19,0

FIG. 12F

FIG. 13A

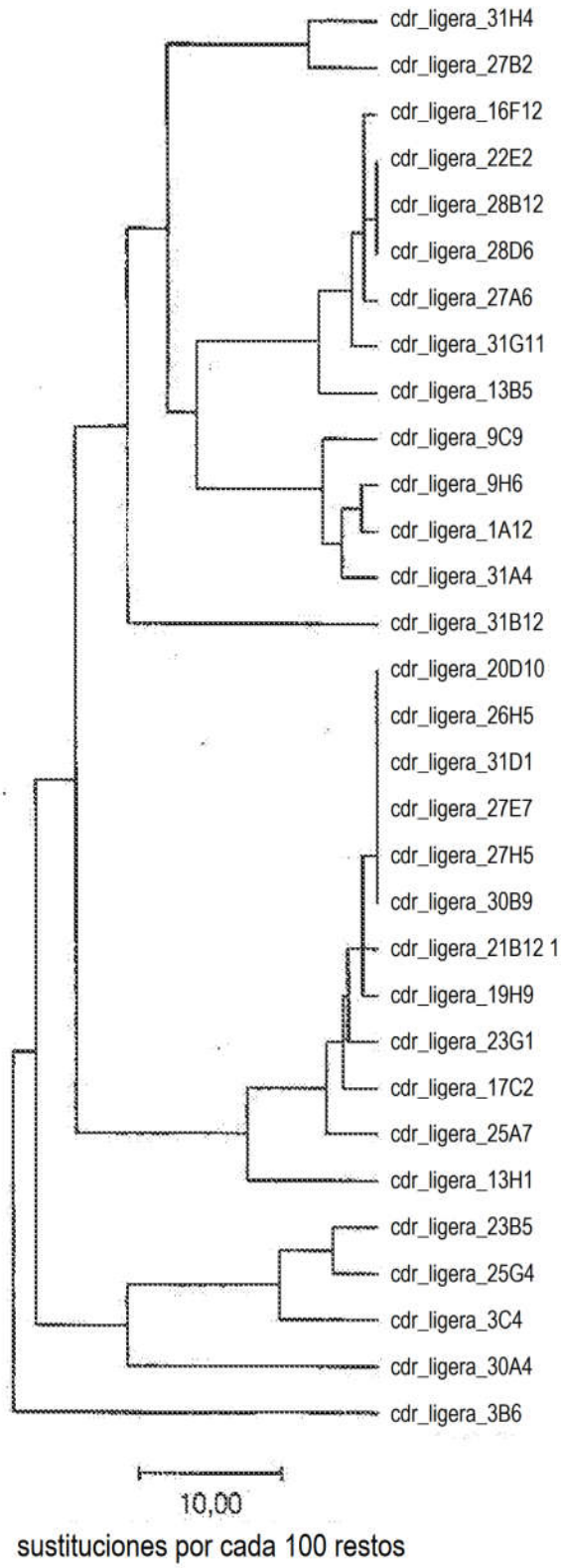

cdr_ligera_31H4
cdr_ligera_27B2
cdr_ligera_16F12
cdr_ligera_22E2
cdr_ligera_28B12
cdr_ligera_28D6
cdr_ligera_27A6
cdr_ligera_31G11
cdr_ligera_13B5
cdr_ligera_9C9
cdr_ligera_9H6
cdr_ligera_1A12
cdr_ligera_31A4
cdr_ligera_31B12
cdr_ligera_20D10
cdr_ligera_26H5
cdr_ligera_31D1
cdr_ligera_27E7
cdr_ligera_27H5
cdr_ligera_30B9
cdr_ligera_21B12 1
cdr_ligera_19H9
cdr_ligera_23G1
cdr_ligera_17C2
cdr_ligera_25A7
cdr_ligera_13H1
cdr_ligera_23B5
cdr_ligera_25G4
cdr_ligera_3C4
cdr_ligera_30A4
cdr_ligera_3B6
10,00
sustituciones por cada 100 restos

FIG. 13B

FIG. 13C

Cadena pesada:

cdr_pesada_20D10	~~GYPLTSYGIS	(SEQ ID NO:168)	WISAYNG.NTNYAQKVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_30B9	~~GYPLTSYGIS	(SEQ ID NO:168)	WISAYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_27E7	~~GYSLTSYGIS	(SEQ ID NO:366)	WISAYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_19H9	~~GYALTSYGIS	(SEQ ID NO:367)	WISAYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:174)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_21B12	~~GYTLTSYGIS	(SEQ ID NO:368)	WVSFYNG.NTN.AQKLQG	(SEQ ID NO:175)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_23G1	~~GYTLTSYGIS	(SEQ ID NO:368)	WVSFYNG.NTN.AQKLQG	(SEQ ID NO:175)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_26H5	~~GYTLTSYGIS	(SEQ ID NO:368)	WISFYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:176)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_31D1	~~GYTLTSYGIS	(SEQ ID NO:368)	WISFYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:176)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_27H5	~~GYTLTSYGIS	(SEQ ID NO:368)	WISVYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:177)	GYGMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:180)
cdr_pesada_17C2	~~GYSFTSYGIS	(SEQ ID NO:369)	WVSAYNG.NTN.AQKFQG	(SEQ ID NO:178)	GYVMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:387)
cdr_pesada_25A7	~~GYTFPSYGIS	(SEQ ID NO:370)	WISAYNG.NTN.AEKLQG	(SEQ ID NO:179)	GYVMDV~~~~~~~~	(SEQ ID NO:387)
cdr_pesada_3B6	~~GYTFTSYGIS	(SEQ ID NO:244)	WISTYNG.NTN.AQKVQG	(SEQ ID NO:252)	GYTRDY~~~~~~~~	(SEQ ID NO:261)
cdr_pesada_9C9	~~GFTFSSYWMS	(SEQ ID NO:371)	NIKQDGS.EKY.VDSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	E....SNWGFAFDI	(SEQ ID NO:385)
cdr_pesada_9H6	~~GFTFSRYWMS	(SEQ ID NO:372)	NIKHDGS.EKY.VDSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	E....SNWGFAFDV	(SEQ ID NO:386)
cdr_pesada_1A12	~~GLTFSNFWMS	(SEQ ID NO:373)	NIKQDGS.EKY.VDSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	E....SNWGFAFDI	(SEQ ID NO:385)
cdr_pesada_23B5	~~GFTFSSYAMN	(SEQ ID NO:374)	TISGSGD.NTY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	KFVLMVYAMLDY~~	(SEQ ID NO:218)
cdr_pesada_25G4	~~GFTFSSYAMN	(SEQ ID NO:374)	TISGSGG.NTY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	KFVLMVYAMLDY~~	(SEQ ID NO:218)
cdr_pesada_13B5	~~GFTFSSYAMS	(SEQ ID NO:245)	TISGSGG.RTY.ADSVKG	(SEQ ID NO:253)	E....VGSPFDY~~	(SEQ ID NO:262)
cdr_pesada_22E2	~~GFTFSSFGMH	(SEQ ID NO:188)	LIWNDGS.NKY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	AIAAL.YYYYGMDV	(SEQ ID NO:195)
cdr_pesada_28B12	~~GFTFSSFGMH	(SEQ ID NO:188)	LIWNDGS.NKY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	AIAAL.YYYYGMDV	(SEQ ID NO:195)
cdr_pesada_28D6	~~GFTFSSFGMH	(SEQ ID NO:188)	LIWNDGS.NKY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	AIAAL.YYYYGMDV	(SEQ ID NO:195)
cdr_pesada_16F12	~~GFTFNSFGMH	(SEQ ID NO:375)	LIWSDGS.DEY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	AIAAL.YYYYGMDV	(SEQ ID NO:195)
cdr_pesada_27A6	~~GFTFNSFGMH	(SEQ ID NO:375)	LIWSDGS.DKY.ADSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	AIAAL.YYYYGMDV	(SEQ ID NO:195)
cdr_pesada_31G11	~~GFTFRSYGMH	(SEQ ID NO:376)	LIWHDGS.NTY.VDSVKG	(SEQ ID NO:[illegible])	GIAVA.YYYYGNDV	(SEQ ID NO:196)
cdr_pesada_30A4	~~GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:246)	VIWYDGS.DKY.ADSVKG	(SEQ ID NO:254)	ETGPLKLYYYGMDV	(SEQ ID NO:263)
cdr_pesada_31B12	~~GFTFSSYGMH	(SEQ ID NO:246)	IIWYDGS.NKY.ADSVKG	(SEQ ID NO:255)	R.GGLAARPGGMDV	(SEQ ID NO:264)
cdr_pesada_31H4	~~GFTFSSYSMN	(SEQ ID NO:247)	SISSSSS.YIS.ADSVKG	(SEQ ID NO:256)	DYDFWSAYYDAFDV	(SEQ ID NO:265)
cdr_pesada_27B2	GGSISSGGYYWS	(SEQ ID NO:248)	YIYNSGSTY..NPSLKS	(SEQ ID NO:257)	ED.TAMVPY.FDY~	(SEQ ID NO:266)
cdr_pesada_3C4	GGSISSSDYYWS	(SEQ ID NO:249)	YIYYSGSTY..NPSLKS	(SEQ ID NO:258)	GG.VTTYYYAMDV~	(SEQ ID NO:267)
cdr_pesada_31A4	GGSFSA..YYWN	(SEQ ID NO:250)	EINHSGRTD..NPSLKS	(SEQ ID NO:259)	GQ.LVPFDY~~~~~	(SEQ ID NO:268)
cdr_pesada_13H1	GDSVSSNSAAWN	(SEQ ID NO:251)	RTYYRSKWYKN.SVSVKS	(SEQ ID NO:260)	GGPTAAFDY~~~~~	(SEQ ID NO:269)
Consenso			*			

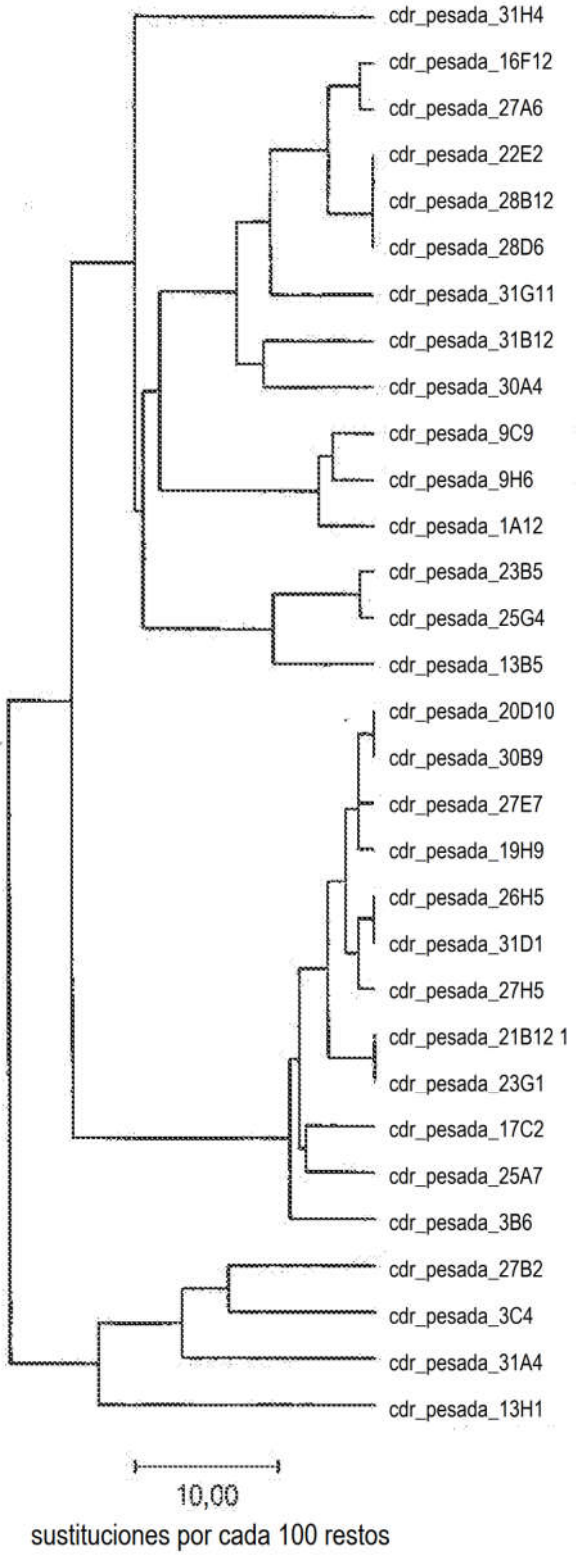

cdr_pesada_31H4
cdr_pesada_16F12
cdr_pesada_27A6
cdr_pesada_22E2
cdr_pesada_28B12
cdr_pesada_28D6
cdr_pesada_31G11
cdr_pesada_31B12
cdr_pesada_30A4
cdr_pesada_9C9
cdr_pesada_9H6
cdr_pesada_1A12
cdr_pesada_23B5
cdr_pesada_25G4
cdr_pesada_13B5
cdr_pesada_20D10
cdr_pesada_30B9
cdr_pesada_27E7
cdr_pesada_19H9
cdr_pesada_26H5
cdr_pesada_31D1
cdr_pesada_27H5
cdr_pesada_21B12 1
cdr_pesada_23G1
cdr_pesada_17C2
cdr_pesada_25A7
cdr_pesada_3B6
cdr_pesada_27B2
cdr_pesada_3C4
cdr_pesada_31A4
cdr_pesada_13H1
10,00
sustituciones por cada 100 restos

FIG. 13D

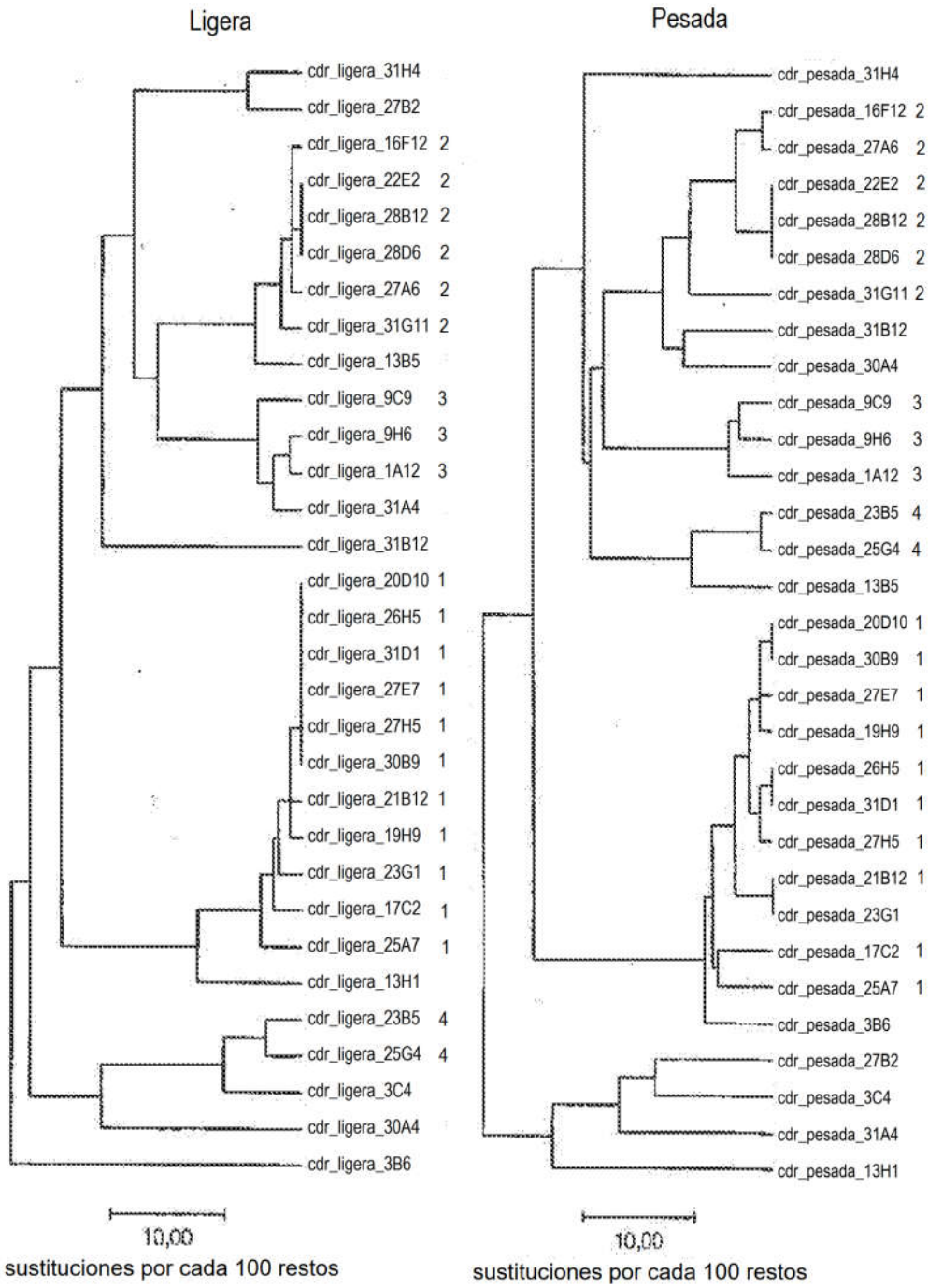

Ligera
cdr_ligera_31H4
cdr_ligera_27B2
cdr_ligera_16F12 2
cdr_ligera_22E2 2
cdr_ligera_28B12 2
cdr_ligera_28D6 2
cdr_ligera_27A6 2
cdr_ligera_31G11 2
cdr_ligera_13B5
cdr_ligera_9C9 3
cdr_ligera_9H6 3
cdr_ligera_1A12 3
cdr_ligera_31A4
cdr_ligera_31B12
cdr_ligera_20D10 1
cdr_ligera_26H5 1
cdr_ligera_31D1 1
cdr_ligera_27E7 1
cdr_ligera_27H5 1
cdr_ligera_30B9 1
cdr_ligera_21B12 1
cdr_ligera_19H9 1
cdr_ligera_23G1 1
cdr_ligera_17C2 1
cdr_ligera_25A7 1
cdr_ligera_13H1
cdr_ligera_23B5 4
cdr_ligera_25G4 4
cdr_ligera_3C4
cdr_ligera_30A4
cdr_ligera_3B6
10,00
sustituciones por cada 100 restos
Pesada
cdr_pesada_31H4
cdr_pesada_16F12 2
cdr_pesada_27A6 2
cdr_pesada_22E2 2
cdr_pesada_28B12 2
cdr_pesada_28D6 2
cdr_pesada_31G11 2
cdr_pesada_31B12
cdr_pesada_30A4
cdr_pesada_9C9 3
cdr_pesada_9H6 3
cdr_pesada_1A12 3
cdr_pesada_23B5 4
cdr_pesada_25G4 4
cdr_pesada_13B5
cdr_pesada_20D10 1
cdr_pesada_30B9 1
cdr_pesada_27E7 1
cdr_pesada_19H9 1
cdr_pesada_26H5 1
cdr_pesada_31D1 1
cdr_pesada_27H5 1
cdr_pesada_21B12 1
cdr_pesada_23G1
cdr_pesada_17C2 1
cdr_pesada_25A7 1
cdr_pesada_3B6
cdr_pesada_27B2
cdr_pesada_3C4
cdr_pesada_31A4
cdr_pesada_13H1
10,00
sustituciones por cada 100 restos

FIG. 13E

Consenso para grupo 1:
cdr_ligera_pesada_20D10 TGTSSDVGGYNSVS (SEQ ID NO:158) EVSNRPS (SEQ ID NO:162) SSYTSTSTVV (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_39B9 S G (SEQ ID NO:158) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_27E7 S G (SEQ ID NO:158) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_19H9 S G (SEQ ID NO:159) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_21B12 S G (SEQ ID NO:158) S (SEQ ID NO:162) N TSM (SEQ ID NO:165)
cdr_ligera_pesada_23G1 S G (SEQ ID NO:158) H (SEQ ID NO:163) N TSM (SEQ ID NO:165)
cdr_ligera_pesada_26H5 S G (SEQ ID NO:158) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_31D1 S G (SEQ ID NO:158) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_27H5 S G (SEQ ID NO:158) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:164)
cdr_ligera_pesada_17C2 S N (SEQ ID NO:160) S (SEQ ID NO:162) S TSM (SEQ ID NO:166)
cdr_ligera_pesada_25A7 S N (SEQ ID NO:161) S (SEQ ID NO:162) S SSM (SEQ ID NO:167)
GWDTSVGIS (SEQ ID NO:168) WISAYNGNTNYAQKVQG (SEQ ID NO:174) GYGMDV (SEQ ID NO:180)
FDT (SEQ ID NO:168) I A Q V (SEQ ID NO:174) G (SEQ ID NO:180)
SDT (SEQ ID NO:169) I A Q V (SEQ ID NO:174) G (SEQ ID NO:180)
ADT (SEQ ID NO:170) I A Q V (SEQ ID NO:174) G (SEQ ID NO:180)
TDT (SEQ ID NO:171) M E Q V (SEQ ID NO:175) G (SEQ ID NO:180)
TDT ($EQ ID NO:171) M E Q E (SEQ ID NO:175) G ($EQ ID NO:180)
TDT (SEQ ID NO:171) I E Q V (SEQ ID NO:176) G (SEQ ID NO:180)
TDT (SEQ ID NO:171) I E Q V (SEQ ID NO:176) G (SEQ ID NO:180)
TDT (SEQ ID NO:171) I V Q V (SEQ ID NO:177) G (SEQ ID NO:180)
SFT (SEQ TD NO:172) M A Q E (SEQ ID NO:178) M (SEQ ID NO:181)
DFP (SEQ ID NO:173) I A P L (SEQ ID NO:179) M (SEQ ID NO:181)
Consenso para grupo 2:
cdr_ligera_pesada_22E2 SGSSSNIGNNFVS (SEQ ID NO:182) DYNKRPS (SEQ ID NO:183) GTWDSSLSGYV (SEQ ID NO:185)
cdr_ligera_pesada_28B12 (SEQ ID NO:182) Y (SEQ ID NO:183) G (SEQ ID NO:185)
cdr_ligera_pesada_28D6 (SEQ ID NO:182) Y (SEQ ID NO:183) G (SEQ ID NO:185)
cdr_ligera_pesada_16F12 (SEQ ID NO:182) Y (SEQ ID NO:183) A (SEQ ID NO:186)
cdr_ligera_pesada_27A6 (SEQ ID NO:182) Y (SEQ ID NO:183) S (SEQ ID NO:187)
cdr_ligera_pesada_31G11 (SEQ ID NO:182) S (SEQ ID NO:184) A (SEQ ID NO:186)
GFTFSSFGMH (SEQ ID NO:188) LIWNDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:191) AIALVYYYYGMDV (SEQ ID NO:195)
S F (SEQ ID NO:188) N NK A (SEQ ID NO:191) A AL (SEQ ID NO:195)
S F (SEQ ID NO:188) N NK A (SEQ ID NO:191) A AL (SEQ ID NO:195)
N F (SEQ ID NO:189) S DE A (SEQ ID NO:192) A AL (SEQ ID NO:195)
N F (SEQ ID NO:188) S DK A (SEQ ID NO:193) A AL (SEQ ID NO:195)
N N (SEQ ID NO:190) H NT V (SEQ ID NO:194) G VA (SEQ ID NO:196)

FIG. 13F

Consenso para grupo 3:
cdr_ligera_pesada_9H6 SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO:197) SNNRRPS (SEQ ID NO:199) AAWDDSLNGWV (SEQ ID NO:201)
cdr_ligera_pesada_1A12 R (SEQ ID NO:198) S R S (SEQ ID NO:199)
cdr_ligera_pesada_9C9 K (SEQ ID NO:198) R D D (SEQ ID NO:200)
cdr_ligera_pesada_9H6 GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:202) WISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:205) DSNWGFAFDY (SEQ ID NO:207)
cdr_ligera_pesada_1A12 (SEQ ID NO:203) (SEQ ID NO:206) (SEQ ID NO:208)
cdr_ligera_pesada_9C9 (SEQ ID NO:204) (SEQ ID NO:206) (SEQ ID NO:208)
Consenso para grupo 4:
cdr_ligera_pesada_23B5 RASQSISSYLN (SEQ ID NO:209) AASSLQS (SEQ ID NO:211) QQSYSTPIT (SEQ ID NO:213)
cdr_ligera_pesada_25G4 (SEQ ID NO:210) (SEQ ID NO:212) (SEQ ID NO:214)
cdr_ligera_pesada_23B5 GFTFSSYAMM (SEQ ID NO:215) TISGSGNTYYADSVKG (SEQ ID NO:216) KFVLMVYAMDGY (SEQ ID NO:218)
cdr_ligera_pesada_25G4 (SEQ ID NO:217)

FIG. 13G

Grupo 1 (11 miembros)

	LV_CDR1	SEQ ID NO:	LV_CDR2	SEQ ID NO:	LV_CDR3	SEQ ID NO:	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
	1										58	
CONSENSO	TGTSSDVGGYNSVS	305	EVSNRPS	306	SSYTSTSMV	307	SYGIS	308	WISAYNGNTNYAQKVQG	309	GYGMDV	310
25A7	........R.....	311	....	312	.....S.V.	313	.....	308	............E.L..	314	..V...	315
17C2	........A.....	316	....	312	......N..	317	.....	308	.V..........F..	318	..V...	315
21B12	....	305	....	312	N........	319	.....	308	.V.F.........L..	320	.....	310
23G1	....	305	..T....	321	N........	319	.....	308	.V.F.........L..	320	.....	310
19H9	...N..........	322	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310
27H5	....	305	....	312	....	307	.....	308	...V............	323	.....	310
26H5	....	305	....	312	....	307	.....	308	...F............	324	.....	310
31D1	....	305	....	312	....	307	.....	308	...F............	324	.....	310
27E7	....	305	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310
20D10	....	305	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310
30B9	....	305	....	312	....	307	.....	308	....	309	.....	310

Grupo 2 (6 miembros)

Cadena ligera:

	LV_CDR1	SEQ ID NO:	LV_CDR2	SEQ ID NO:	LV_CDR3	SEQ ID NO:
	1					
CONSENSO	SGSSSNIGNNFVS	325	DYNKRPS	326	GTWDSSLSGYV	327
31G11	....	325	.S.....	331	........A..	332
28D6	....	325	....	326	....	327
28B12	....	325	....	326	....	327
22E2	....	325	....	326	....	327
16F12	....	325	....	326	........A..	332
27A6	....	325	....	326	........S..	337

FIG. 13H

ES 2 810 907 T3

Grupo 2, continuación

Cadena pesada:

	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
						66
CONSENSO	SFGMH	328	LIWNDGSNKYYADSVKG	329	AIAALYYYYGMDV	330
31G11	.Y...	333	...H....T..V.....	334	G..VA.....	335
28D6	.....	328	.....	329	.....	330
28B12	.....	328	.....	329	.....	330
22E2	.....	328	.....	329	.....	330
16F12	.....	328	...S...DE.....	336	.....	330
27A6	.....	328	...S...D.....	338	.....	330

FIG. 13I

Grupo 3 (3 miembros)

	LV_CDR1	SEQ ID NO:	LV_CDR2	SEQ ID NO:	LV_CDR3	SEQ ID NO:	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
	1										62	
CONSENSO	SGSSSNIGSETVN	339	SNNRRPS	340	AAWDDSLNWV	341	YWMS	342	NIKQDGSEKYYVDSVKG	343	ESNWGFAFDI	344
9H6	.........N...	345	....	340	....	341	R....	346	...H..............	347	V	348
9C9	....	339	R..Q..L	349	....	341	S....	350	....	343	....	344
1A12	....	339	....	340	....	341	NF...	351	....	343	....	344

Grupo 4 (2 miembros)

	KV_CDR1	SEQ ID NO:	KV_CDR2	SEQ ID NO:	KV_CDR3	SEQ ID NO:
	1					
CONSENSO	RASQSIS YLN	352	AA SLQS	353	QQSYS PIT	354
25G4	.......I...	355	..A....	356	.....A...	357
23B5	.......S...	358	..S....	359	.....S...	360

	H_CDR1	SEQ ID NO:	H_CDR2	SEQ ID NO:	H_CDR3	SEQ ID NO:
					71	
CONSENSO	SYAMN	361	TISGSG NTYYADSVKG	362	KFVLMVYAMLDY	363
25G4	.....	361	......G..........	364	....	363
23B5	.....	361	......D..........	365	....	363

FIG. 13J

ES 2 810 907 T3

Figura 14

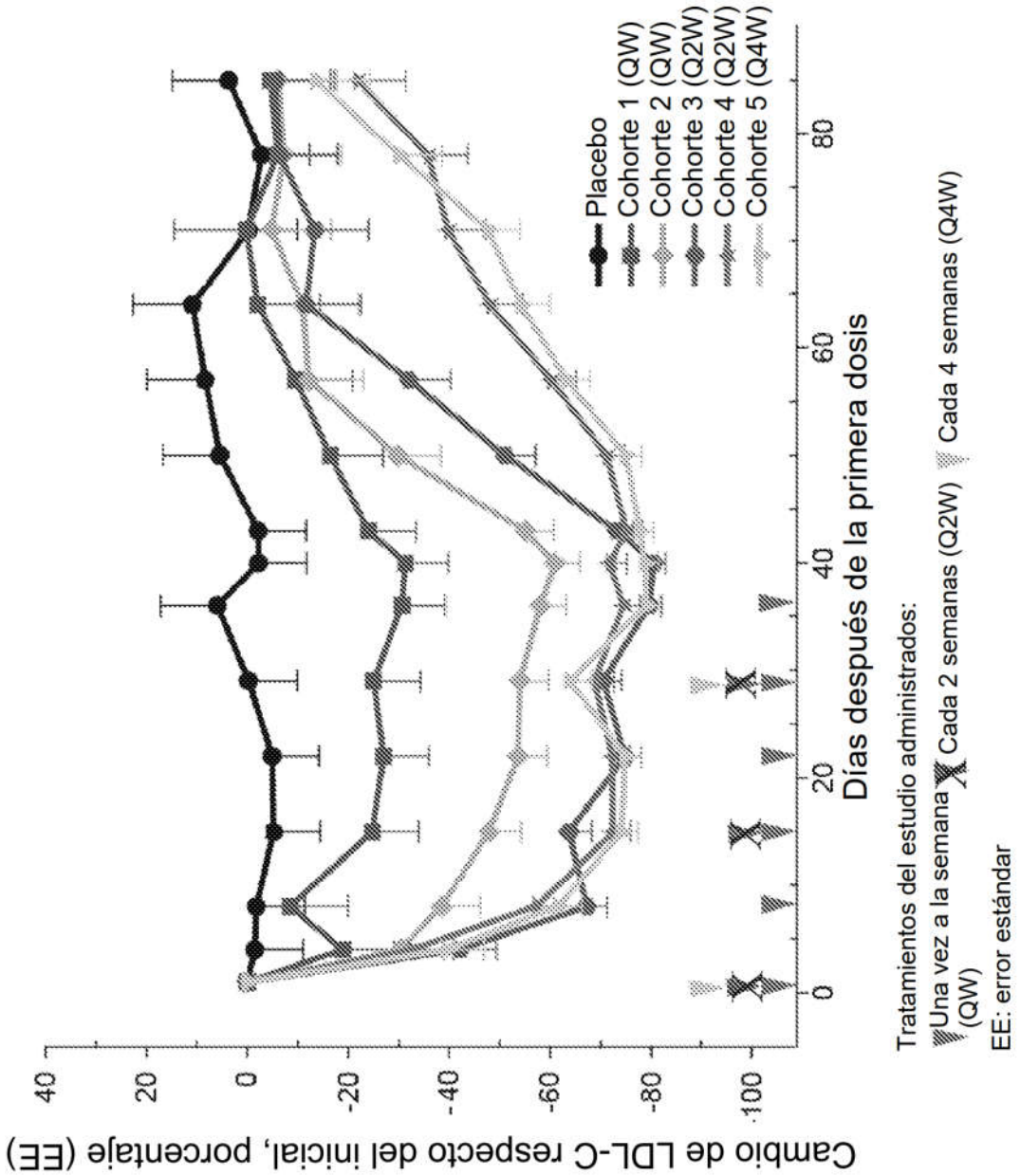

Cambio de LDL-C respecto del inicial, porcentaje (EE)
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Placebo
Cohorte 1 (QW)
Cohorte 2 (QW)
Cohorte 3 (Q2W)
Cohorte 4 (Q2W)
Cohorte 5 (Q4W)
Tratamientos del estudio administrados:
Una vez a la semana (QW)
Cada 2 semanas (Q2W)
Cada 4 semanas (Q4W)
EE: error estándar

Figura 15

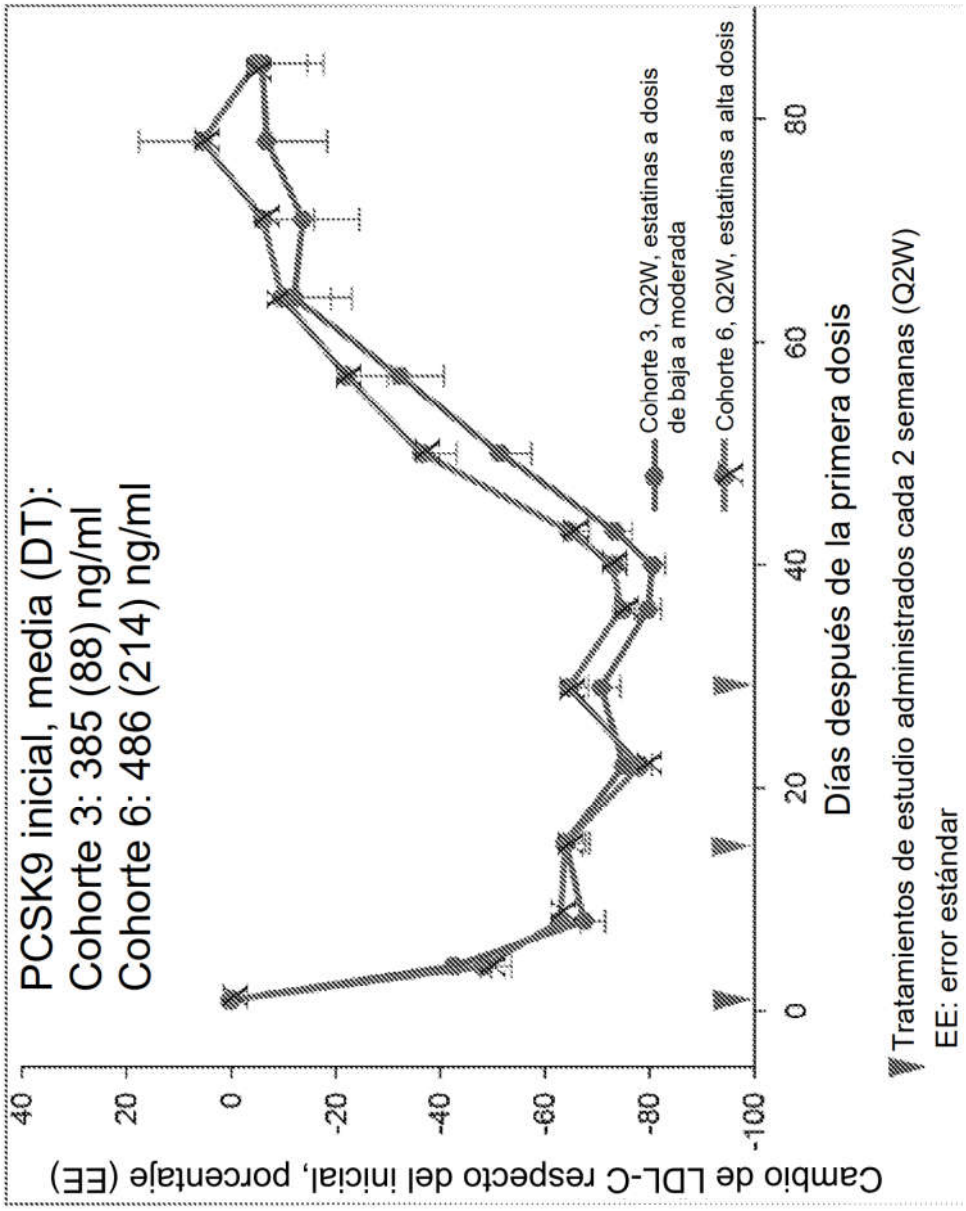

PCSK9 inicial, media (DT):
Cohorte 3: 385 (88) ng/ml
Cohorte 6: 486 (214) ng/ml
Cambio de LDL-C respecto del inicial, porcentaje (EE)
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Cohorte 3, Q2W, estatinas a dosis de baja a moderada
Cohorte 6, Q2W, estatinas a alta dosis
Tratamientos de estudio administrados cada 2 semanas (Q2W)
EE: error estándar

Figura 16

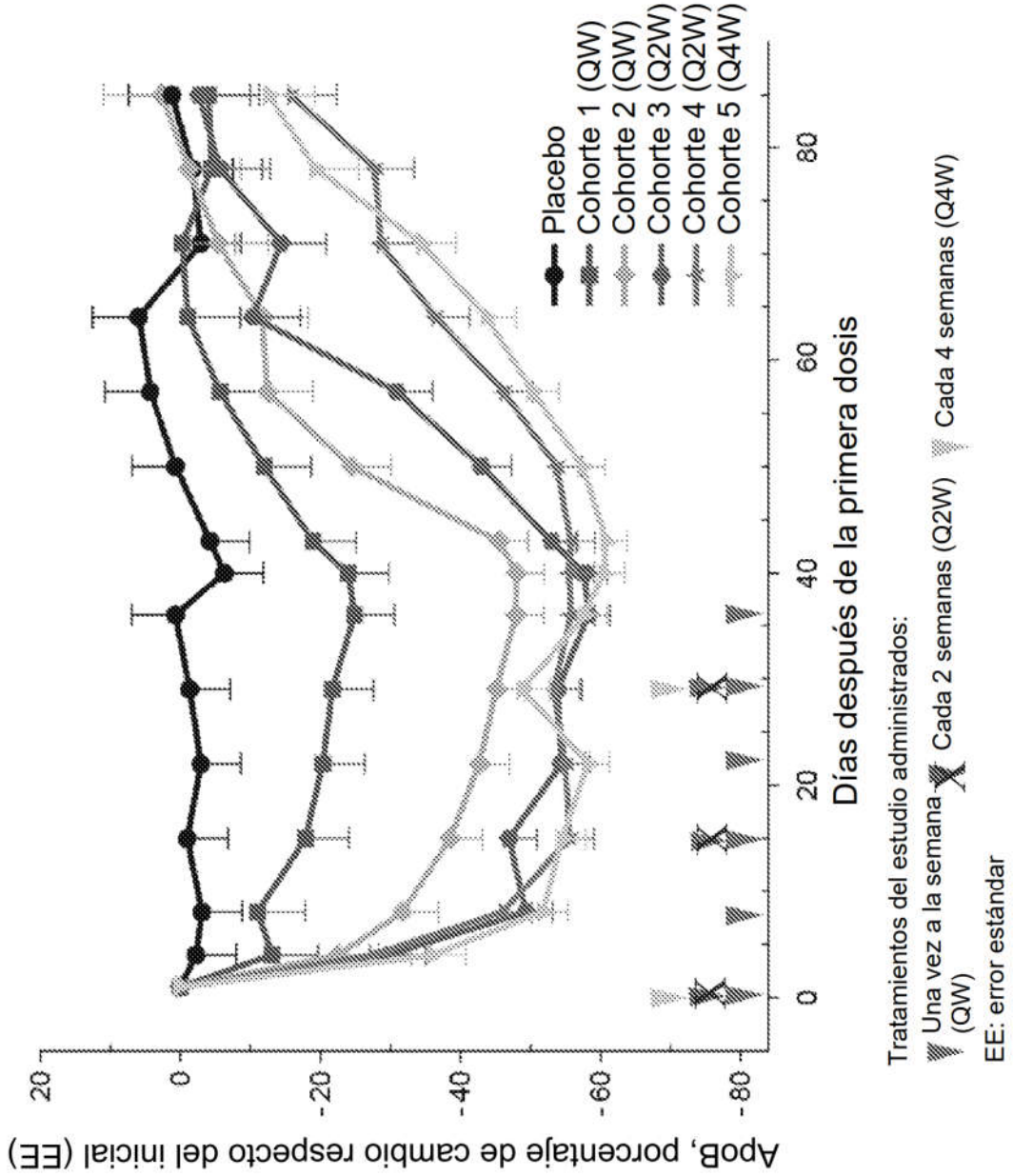
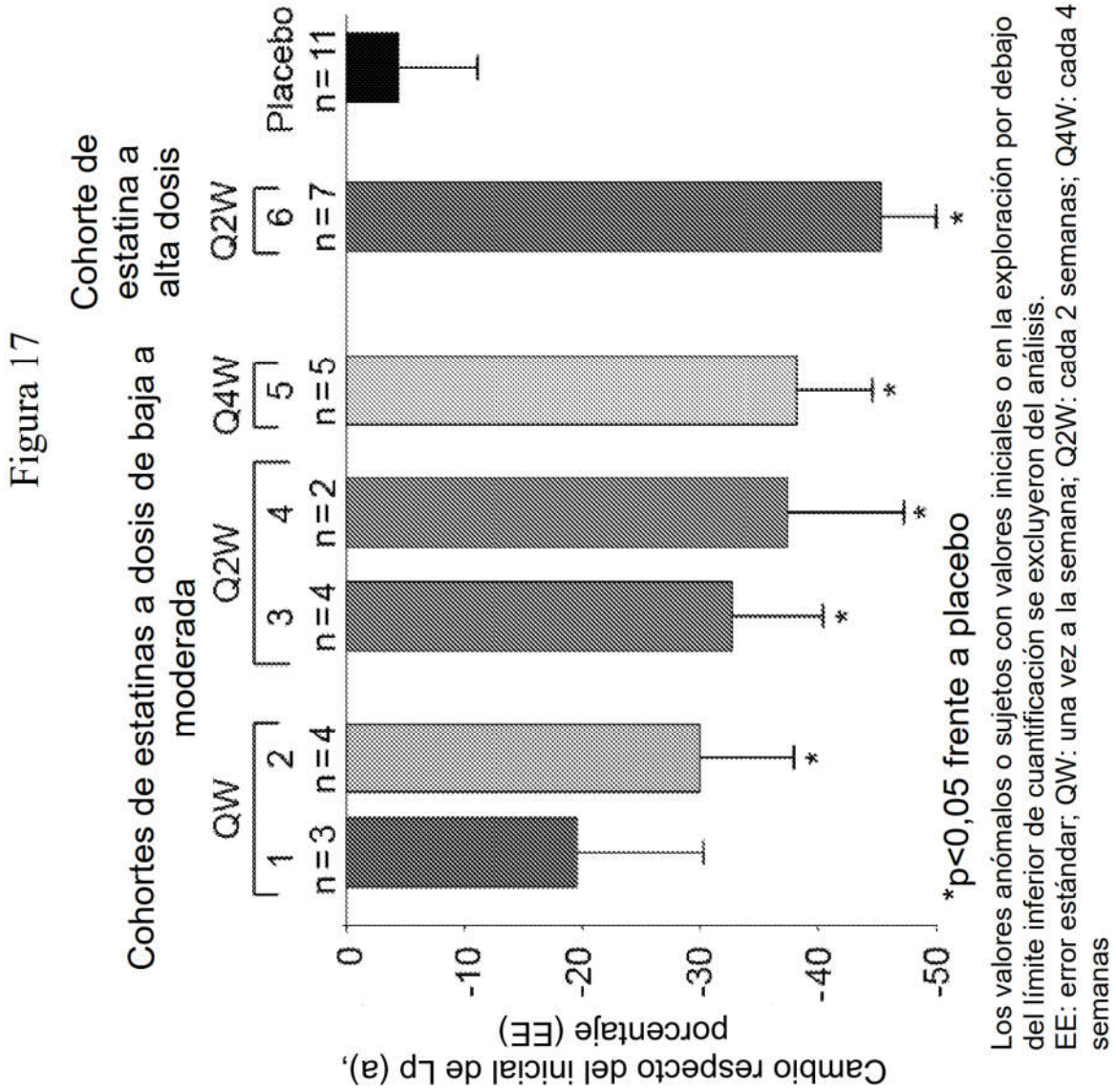

ApoB, porcentaje de cambio respecto del inicial (EE)
20
0
-20
-40
-60
-80
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Placebo
Cohorte 1 (QW)
Cohorte 2 (QW)
Cohorte 3 (Q2W)
Cohorte 4 (Q2W)
Cohorte 5 (Q4W)
Tratamientos del estudio administrados:
Una vez a la semana (QW)
Cada 2 semanas (Q2W)
Cada 4 semanas (Q4W)
EE: error estándar

Figura 17



Los valores anómalos o sujetos con valores iniciales o en la exploración por debajo del límite inferior de cuantificación se excluyeron del análisis.
EE: error estándar; QW: una vez a la semana; Q2W: cada 2 semanas; Q4W: cada 4 semanas

Figura 18

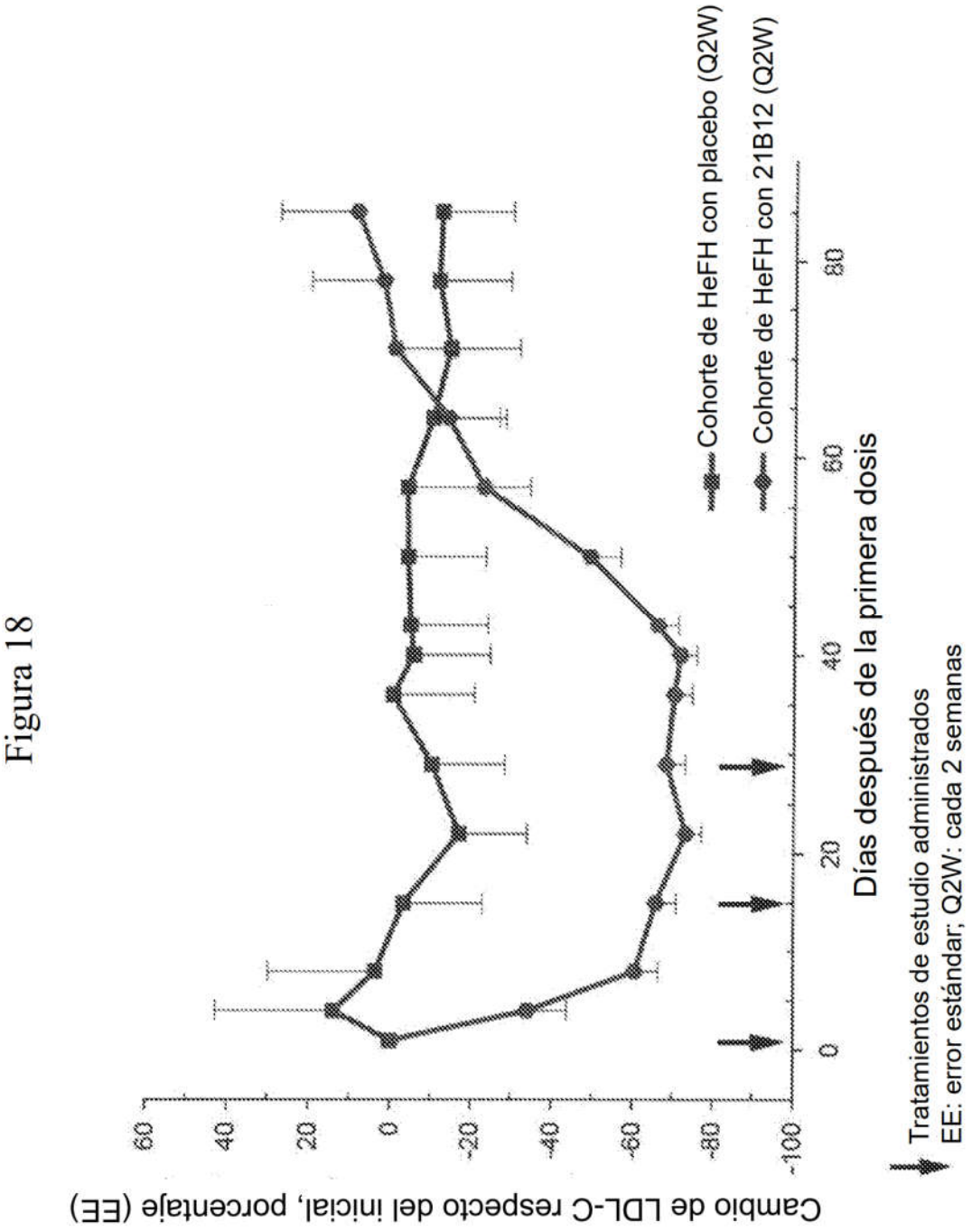

Cambio de LDL-C respecto del inicial, porcentaje (EE)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Cohorte de HeFH con placebo (Q2W)
Cohorte de HeFH con 21B12 (Q2W)
Tratamientos de estudio administrados
EE: error estándar; Q2W: cada 2 semanas

Figura 19

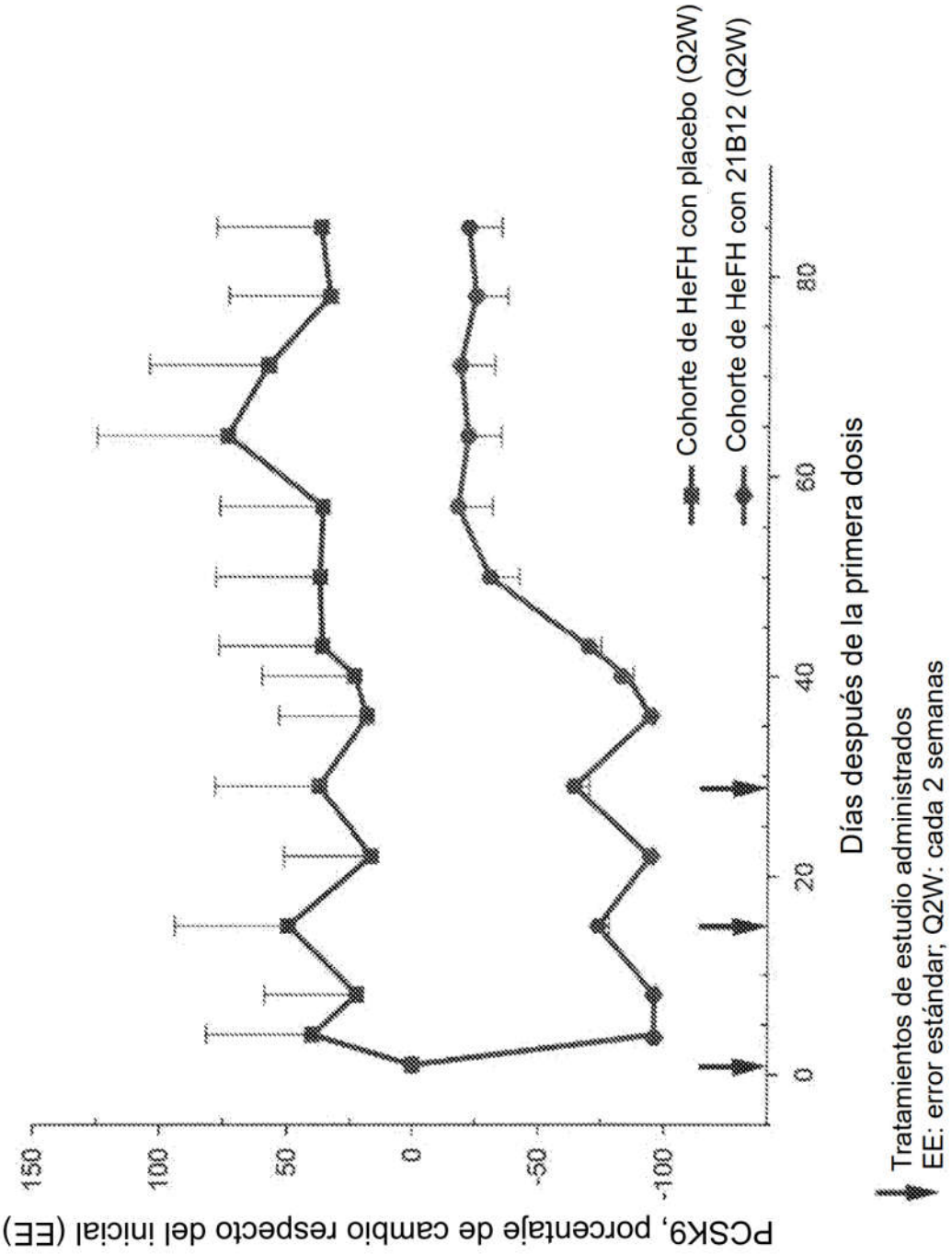

PCSK9, porcentaje de cambio respecto del inicial (EE)
150
100
50
0
-50
-100
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Cohorte de HeFH con placebo (Q2W)
Cohorte de HeFH con 21B12 (Q2W)
Tratamientos de estudio administrados
EE: error estándar; Q2W: cada 2 semanas

Figura 20

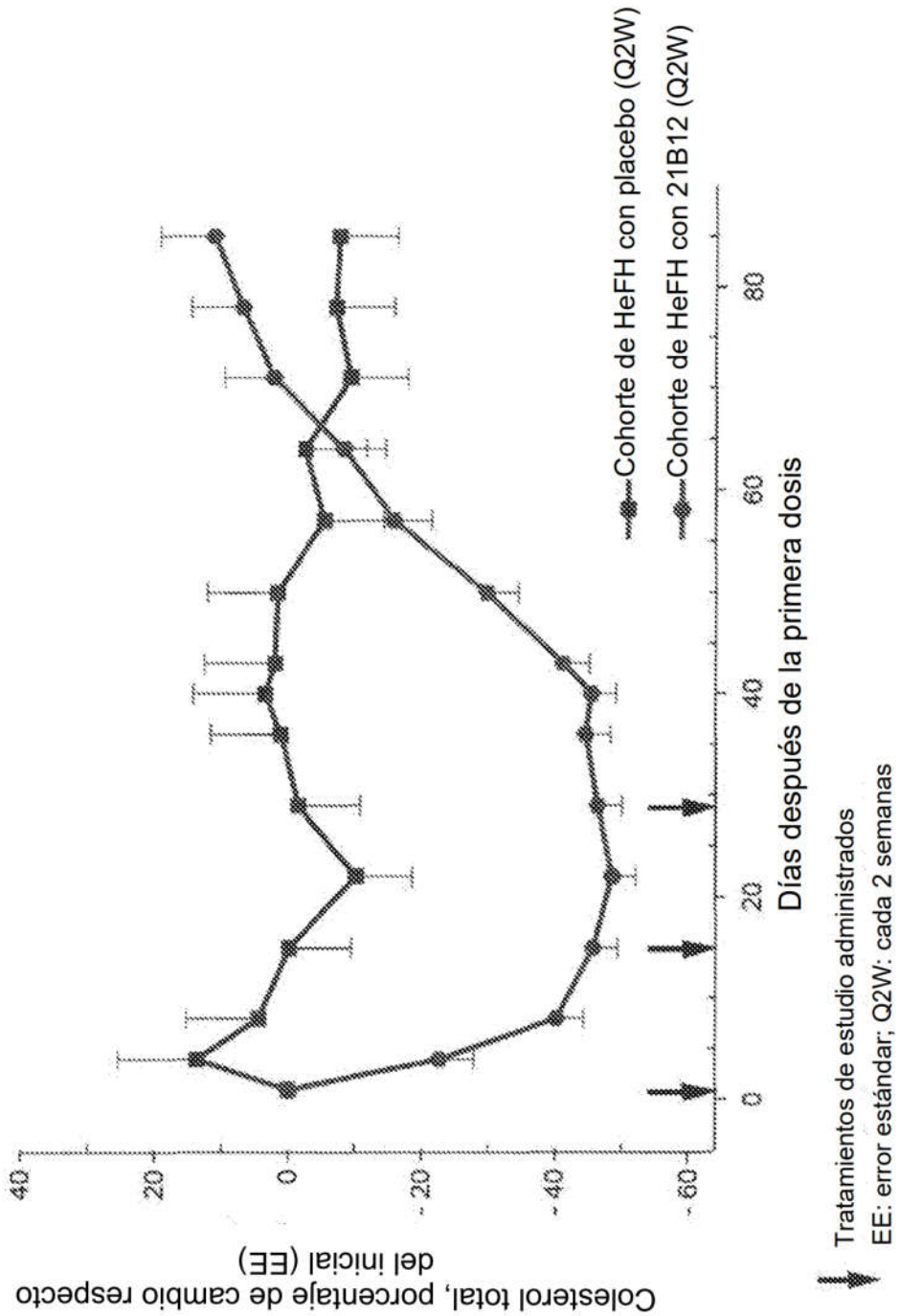

Cohorte de HeFH con placebo (Q2W)
Cohorte de HeFH con 21B12 (Q2W)
Colesterol total, porcentaje de cambio respecto del inicial (EE)
Días después de la primera dosis
40
20
0
-20
-40
-60
0
20
40
60
80
Tratamientos de estudio administrados
EE: error estándar; Q2W: cada 2 semanas

Figura 21

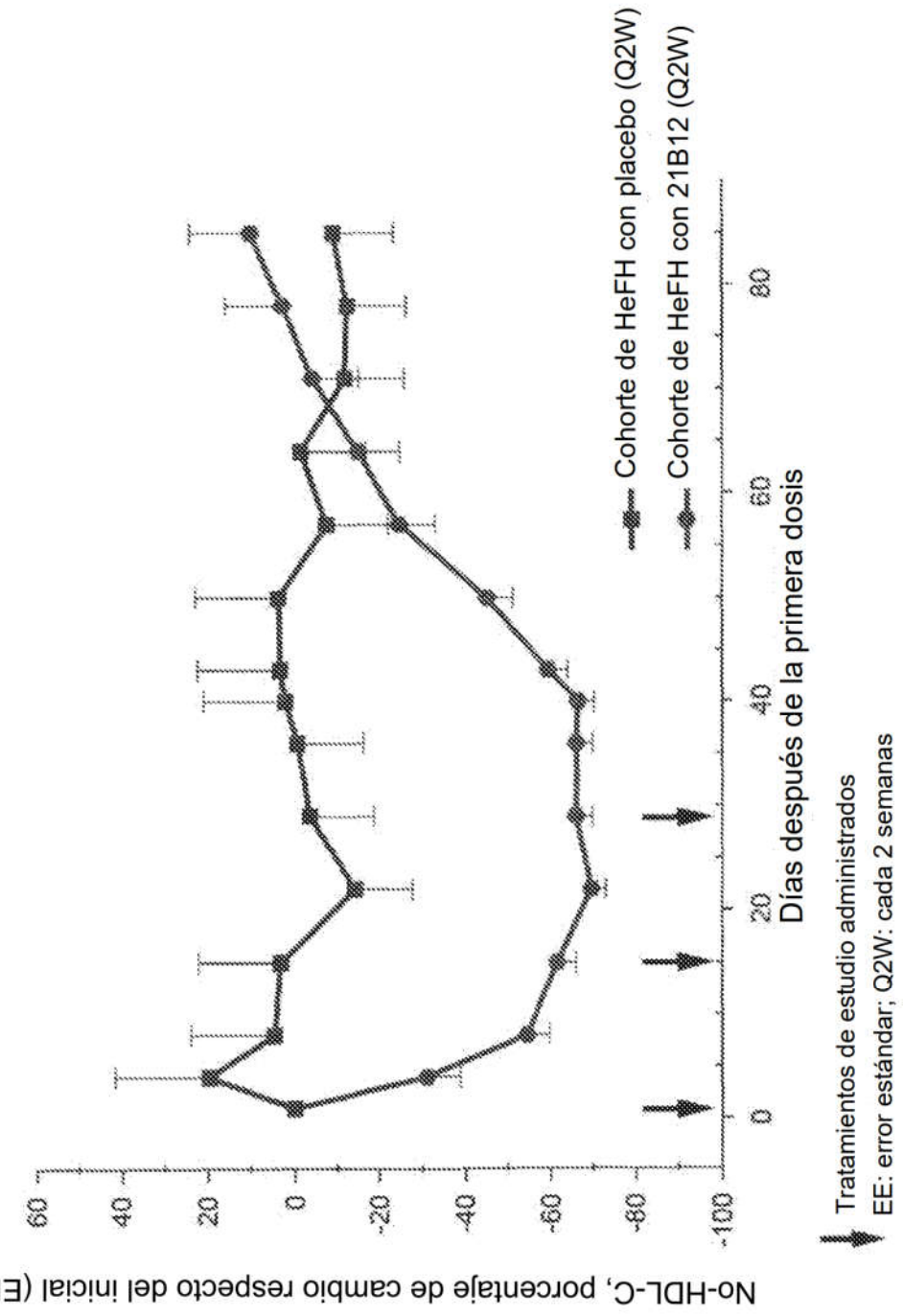

No-HDL-C, porcentaje de cambio respecto del inicial (EE)
60
40
20
0
-20
-40
-60
-80
-100
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Cohorte de HeFH con placebo (Q2W)
Cohorte de HeFH con 21B12 (Q2W)
Tratamientos de estudio administrados
EE: error estándar; Q2W: cada 2 semanas

Figura 22

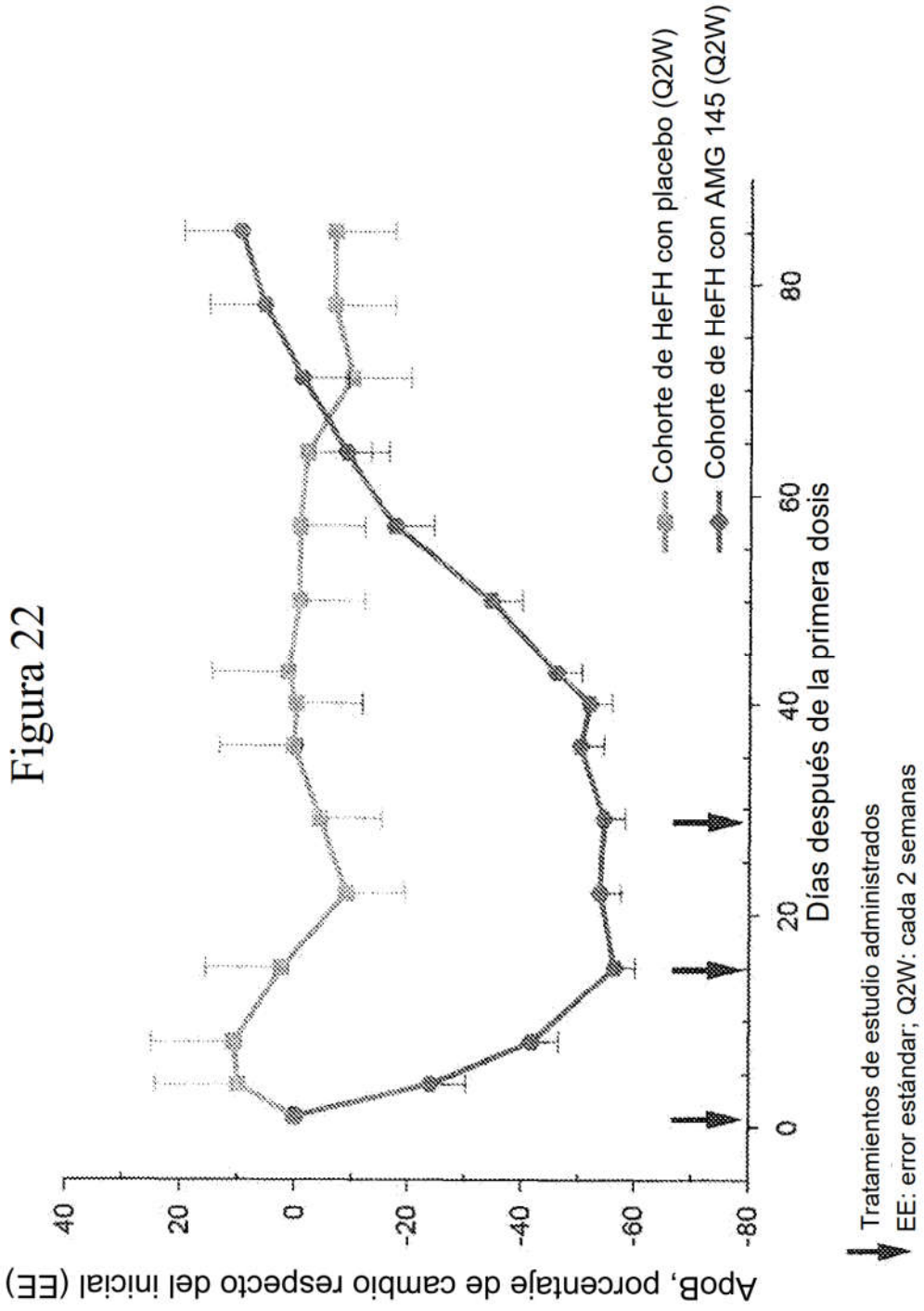

ApoB, porcentaje de cambio respecto del inicial (EE)
40
20
0
-20
-40
-60
-80
0
20
40
60
80
Días después de la primera dosis
Cohorte de HeFH con placebo (Q2W)
Cohorte de HeFH con AMG 145 (Q2W)
Tratamientos de estudio administrados
EE: error estándar; Q2W: cada 2 semanas

Figura 23

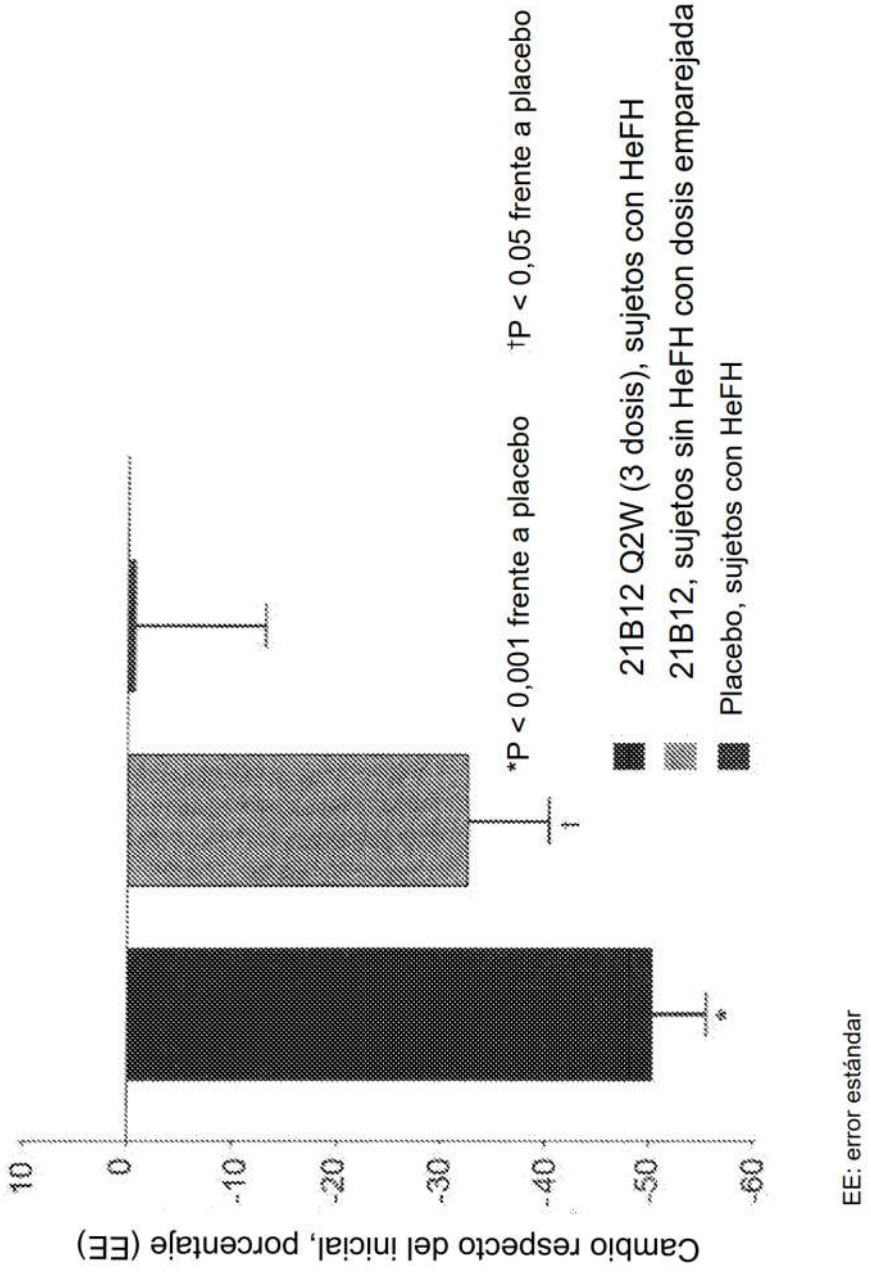

Cambio respecto del inicial, porcentaje (EE)
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
*P < 0,001 frente a placebo
†P < 0,05 frente a placebo
21B12 Q2W (3 dosis), sujetos con HeFH
21B12, sujetos sin HeFH con dosis emparejada
Placebo, sujetos con HeFH
EE: error estándar

Figura 24A

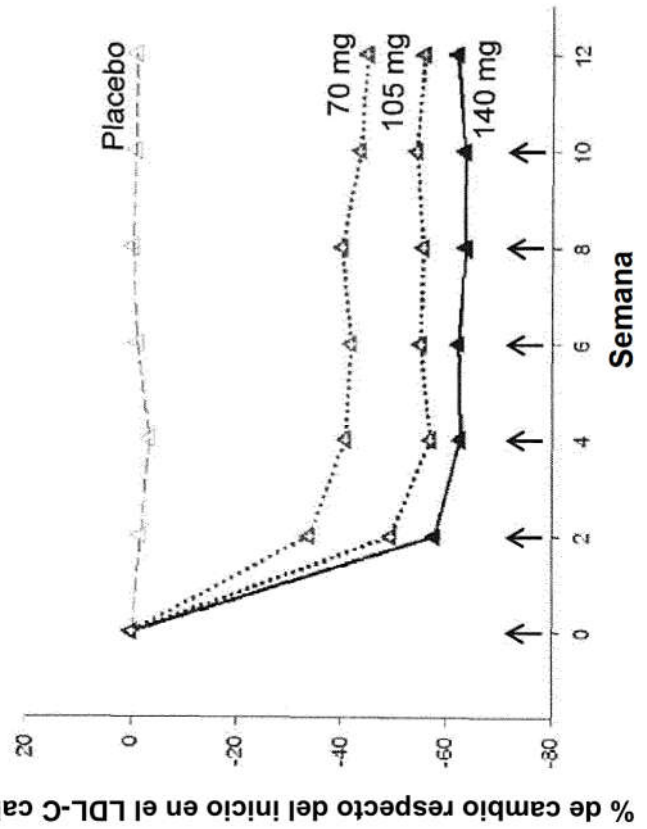


Figura 24B

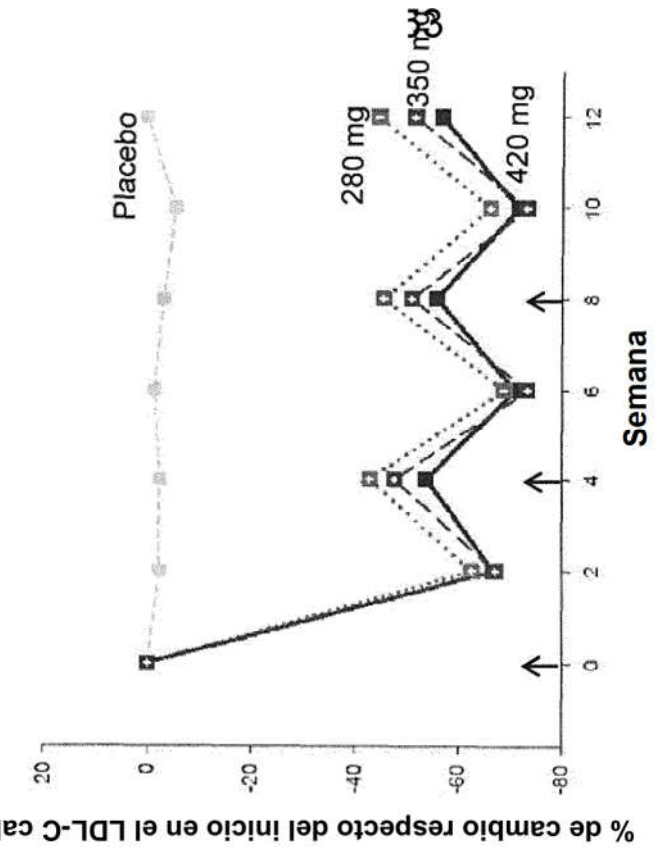


Figura 25A

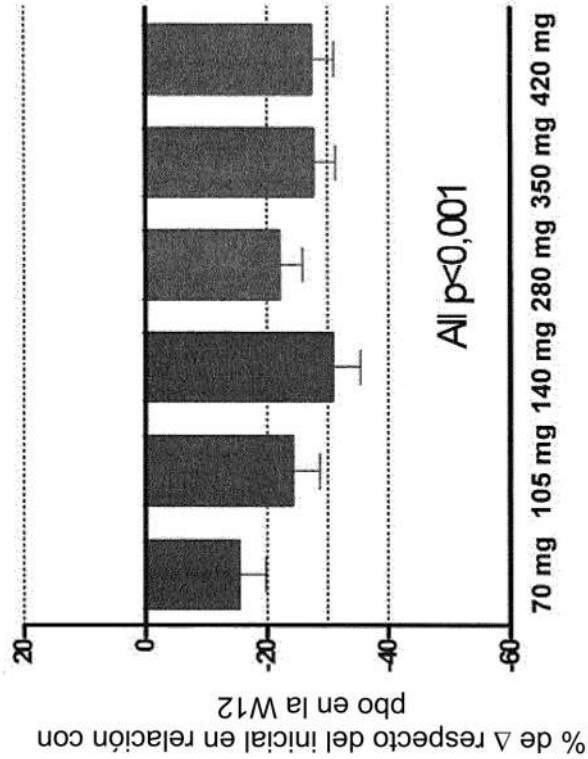


Figura 25B

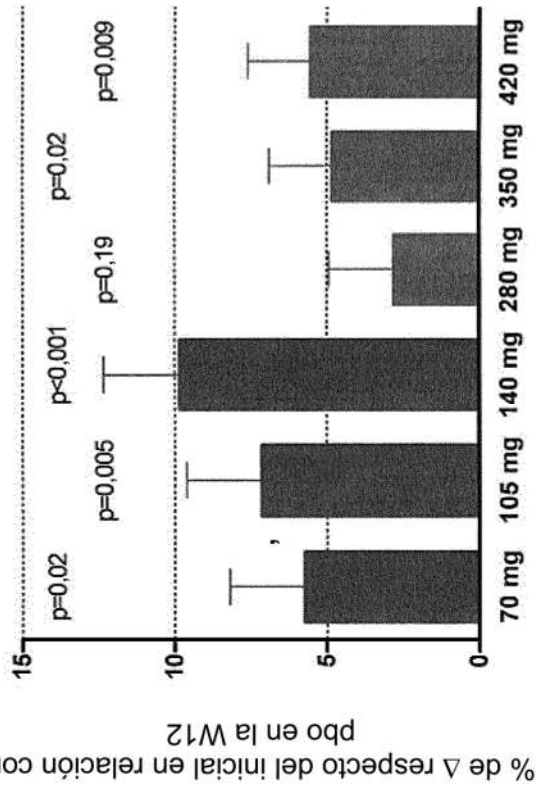


Figura 25D

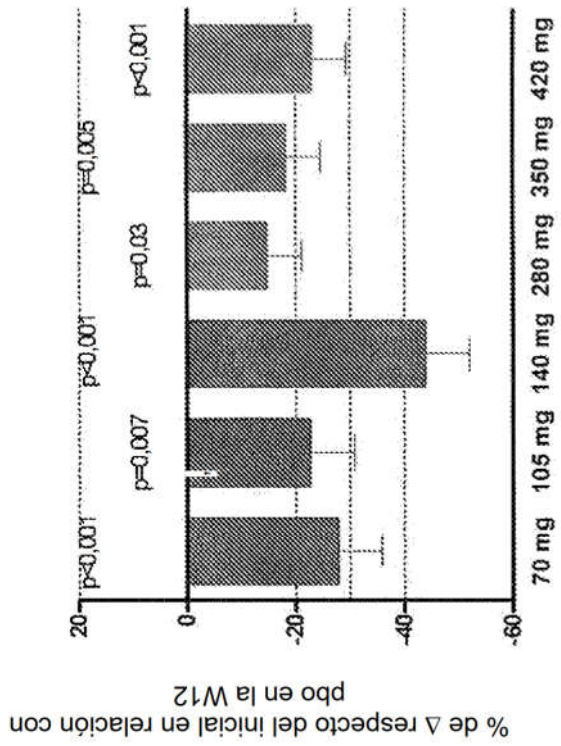


Figura 25C

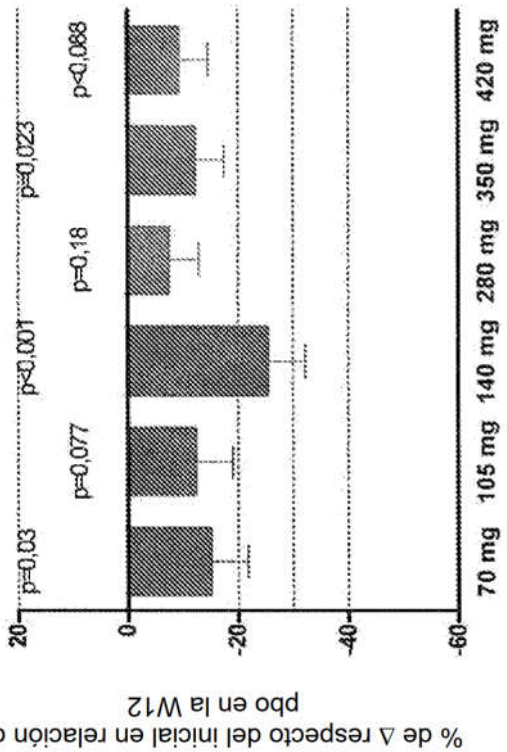


Figura 26

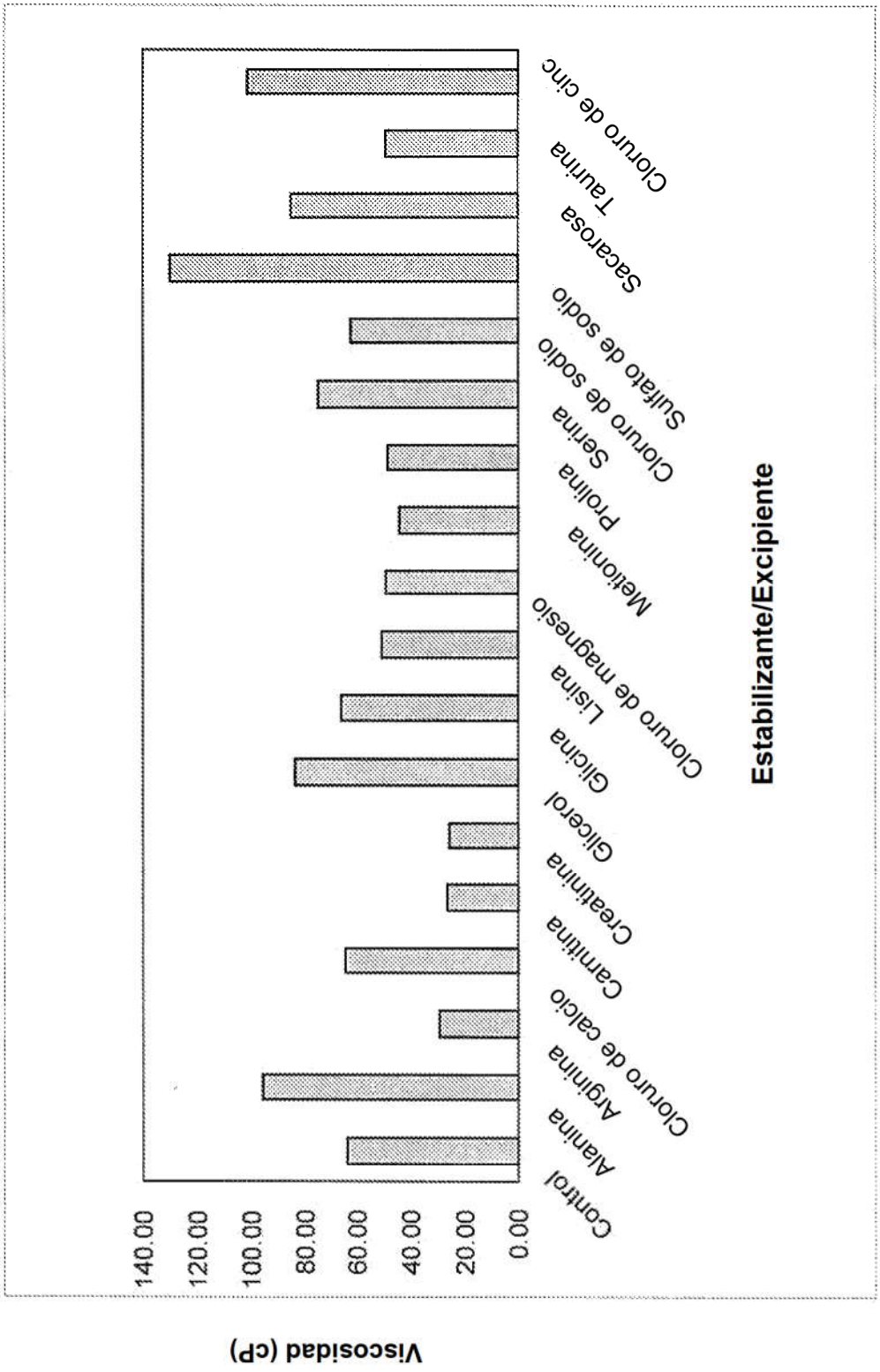

Viscosidad (cP)
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
Control
Alanina
Arginina
Cloruro de calcio
Carnitina
Creatinina
Glicerol
Glicina
Lisina
Cloruro de magnesio
Metionina
Prolina
Serina
Cloruro de sodio
Sulfato de sodio
Sacarosa
Taurina
Cloruro de cinc
Estabilizante/Excipiente

Figura 27

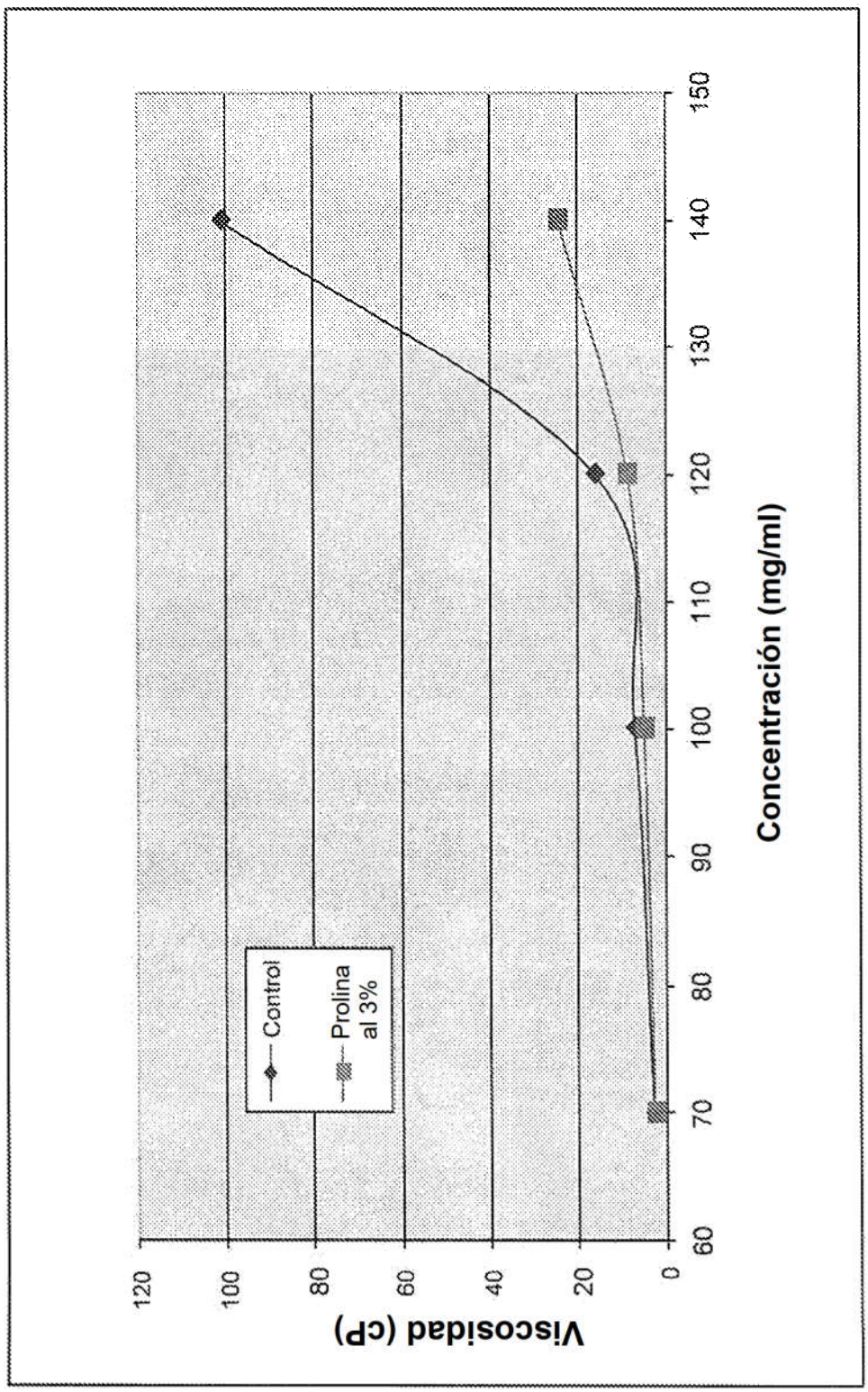

Viscosidad (cP)
120
100
80
60
40
20
0
Concentración (mg/ml)
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
Control
Prolina al 3%

Figura 28A

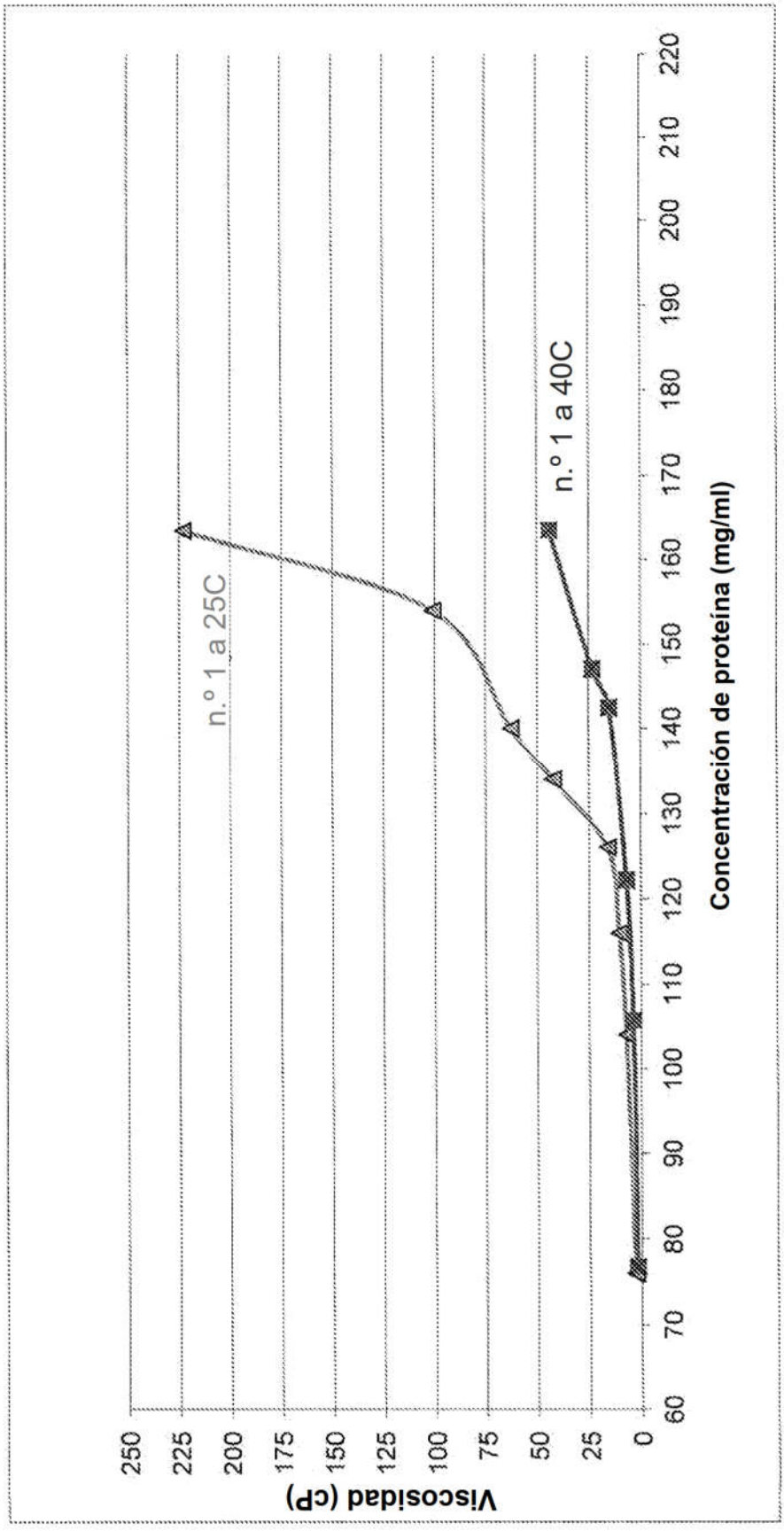

Viscosidad (cP)
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
Concentración de proteína (mg/ml)
n.° 1 a 25C
n.° 1 a 40C

Figura 28B

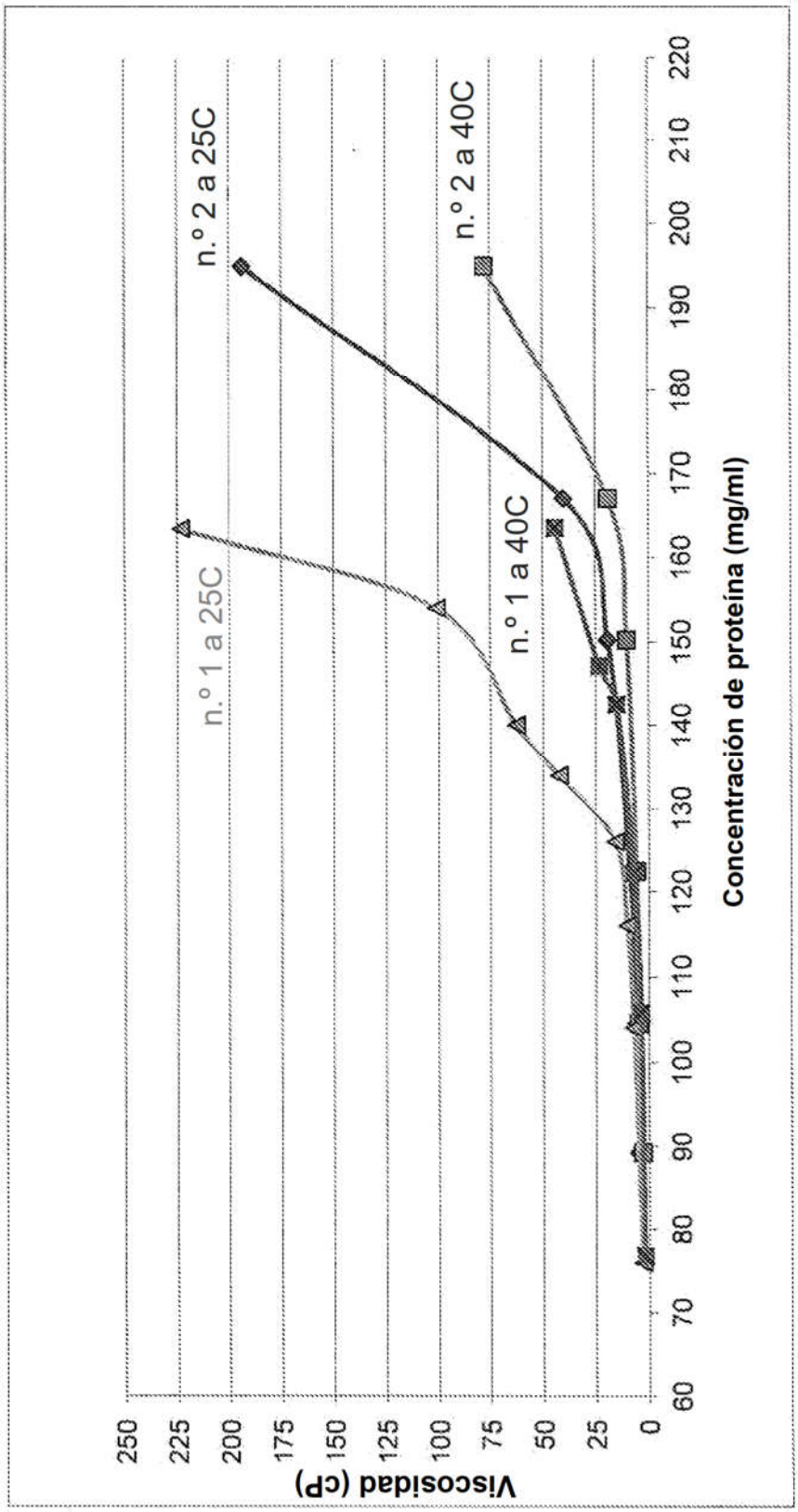

Viscosidad (cP)
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
Concentración de proteína (mg/ml)
n.° 1 a 25C
n.° 2 a 25C
n.° 1 a 40C
n.° 2 a 40C

Figura 28C

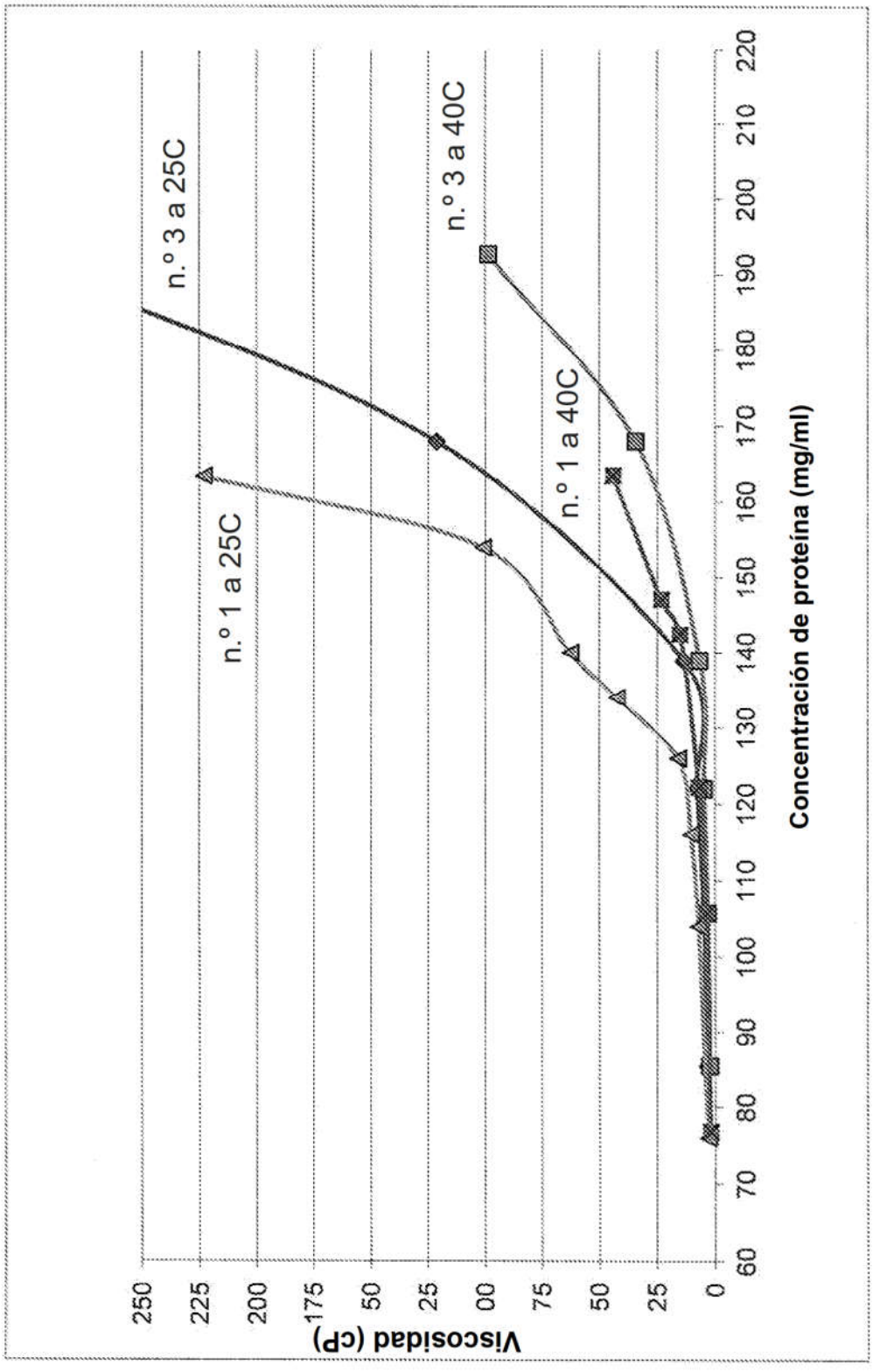

n.º 3 a 25C
n.º 1 a 25C
n.º 3 a 40C
n.º 1 a 40C
Viscosidad (cP)
Concentración de proteína (mg/ml)
250
225
200
175
50
25
00
75
50
25
0
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220

Figura 28D

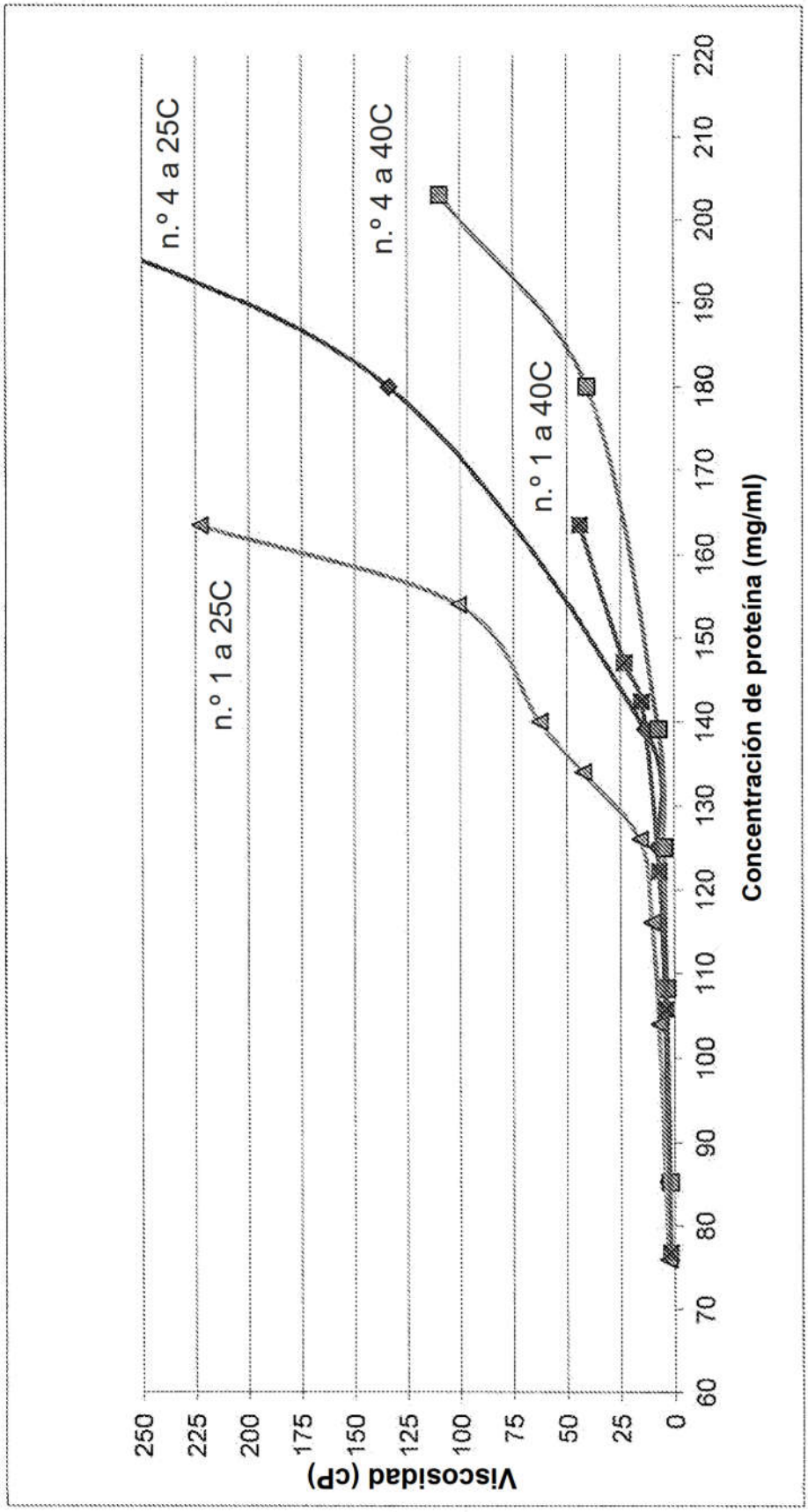

n.º 4 a 25C
n.º 4 a 40C
n.º 1 a 40C
n.º 1 a 25C
Viscosidad (cP)
Concentración de proteína (mg/ml)
250
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220

Figura 29A

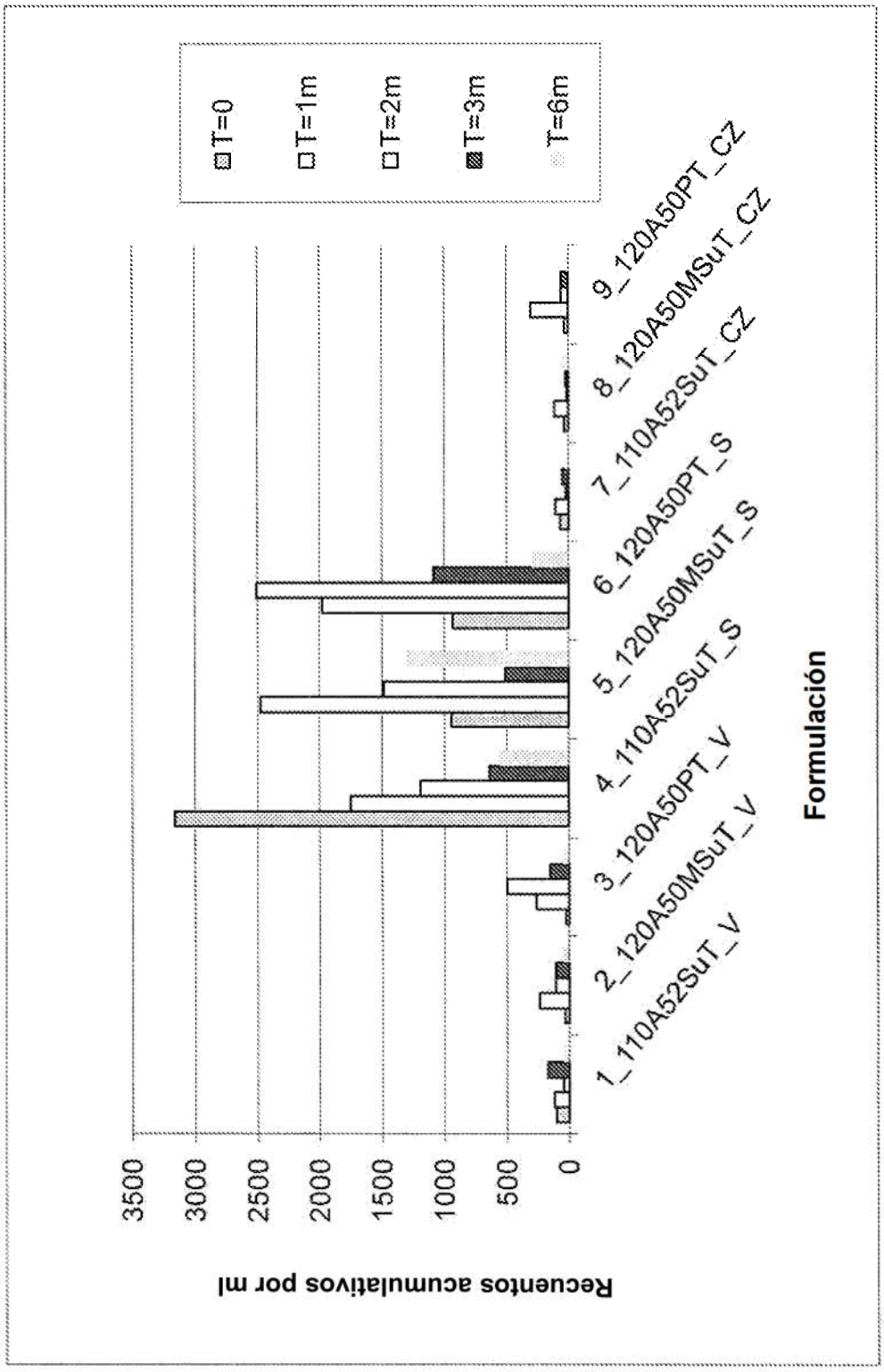

T=0
T=1m
T=2m
T=3m
T=6m
Recuentos acumulativos por ml
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1_110A52SuT_V
2_120A50MSuT_V
3_120A50PT_V
4_110A52SuT_S
5_120A50MSuT_S
6_120A50PT_S
7_110A52SuT_CZ
8_120A50MSuT_CZ
9_120A50PT_CZ
Formulación

Figura 29B

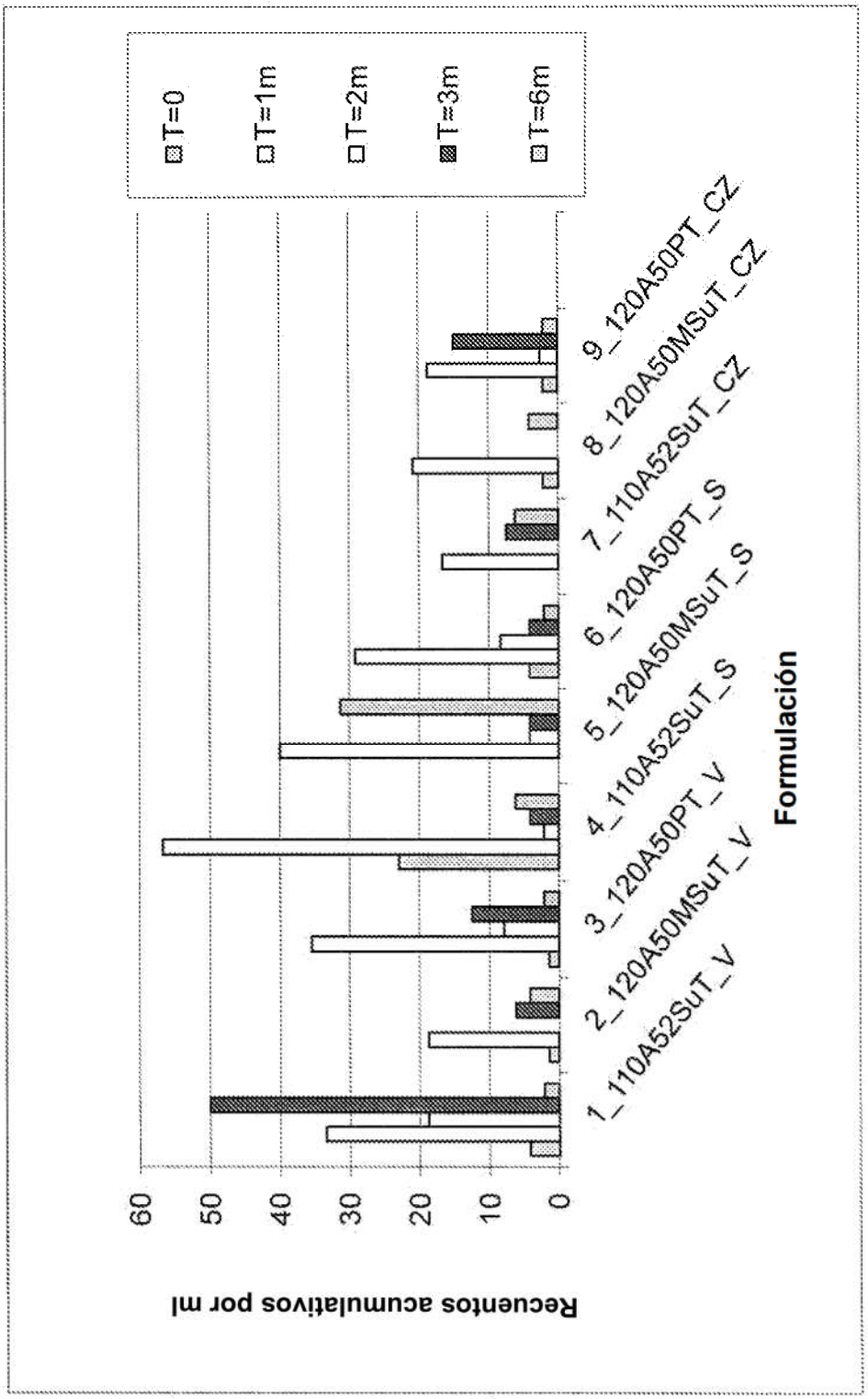

T=0
T=1m
T=2m
T=3m
T=6m
Recuentos acumulativos por ml
0
10
20
30
40
50
60
1_110A52SuT_V
2_120A50MSuT_V
3_120A50PT_V
4_110A52SuT_S
5_120A50MSuT_S
6_120A50PT_S
7_110A52SuT_CZ
8_120A50MSuT_CZ
9_120A50PT_CZ
Formulación

Figura 30A

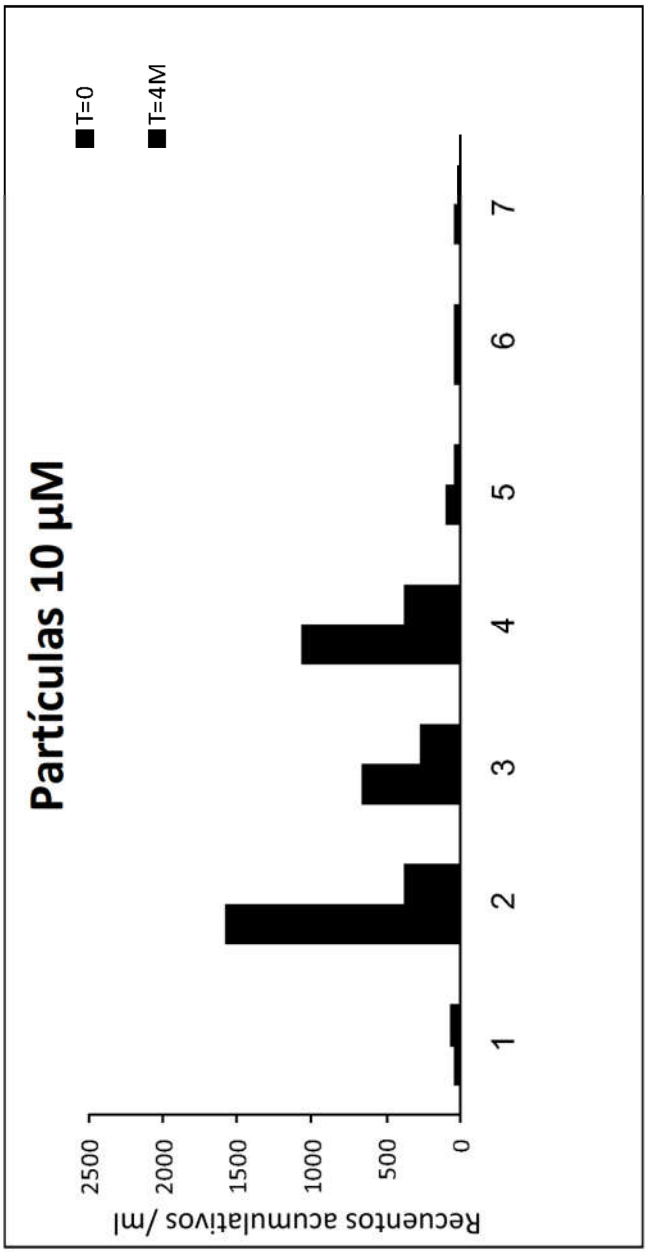
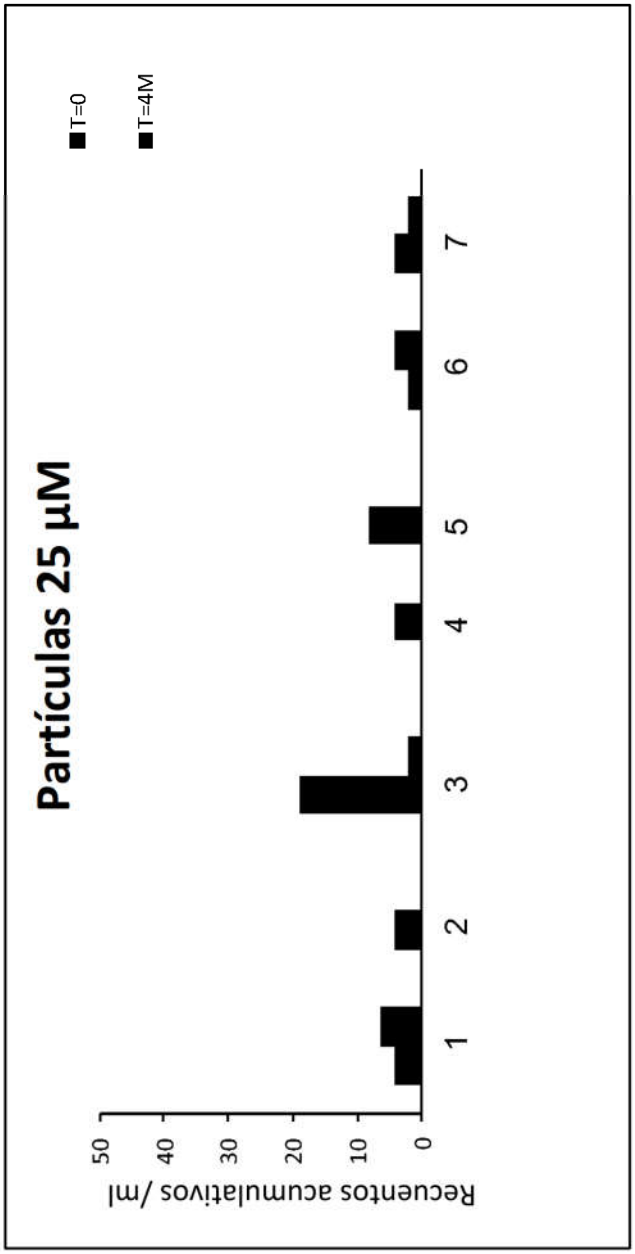

Partículas 10 µM
T=0
T=4M
Recuentos acumulativos /ml
2500
2000
1500
1000
500
0
1
2
3
4
5
6
7

Figura 30B


Partículas 25 µM
T=0
T=4M
Recuentos acumulativos /ml
0
10
20
30
40
50
1
2
3
4
5
6
7

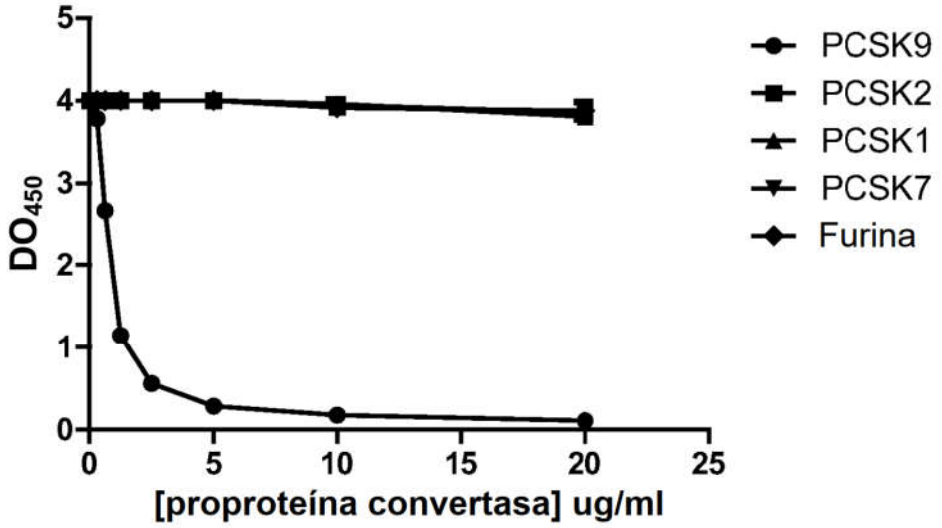

5
4
3
2
1
0
DO450
0
5
10
15
20
25
[proproteína convertasa] ug/ml
PCSK9
PCSK2
PCSK1
PCSK7
Furina

FIGURA 31

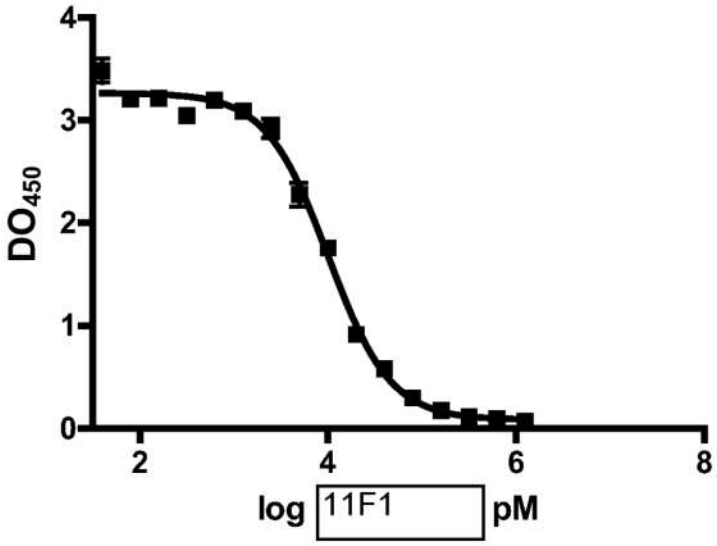


Figura 32

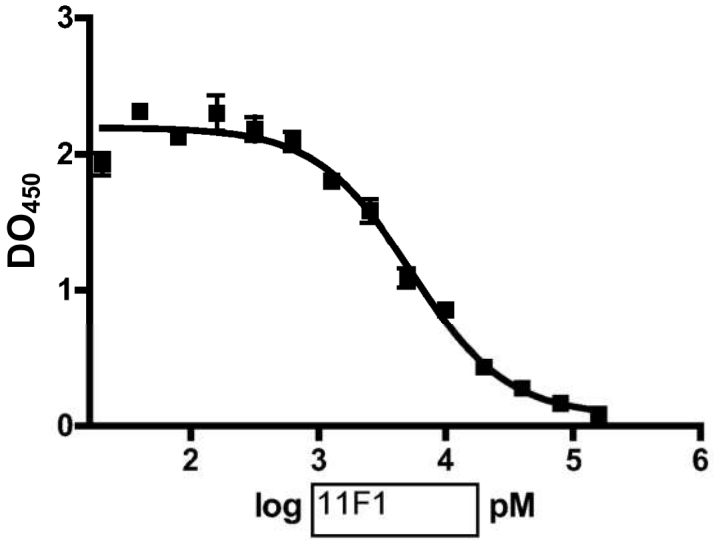


Figura 33

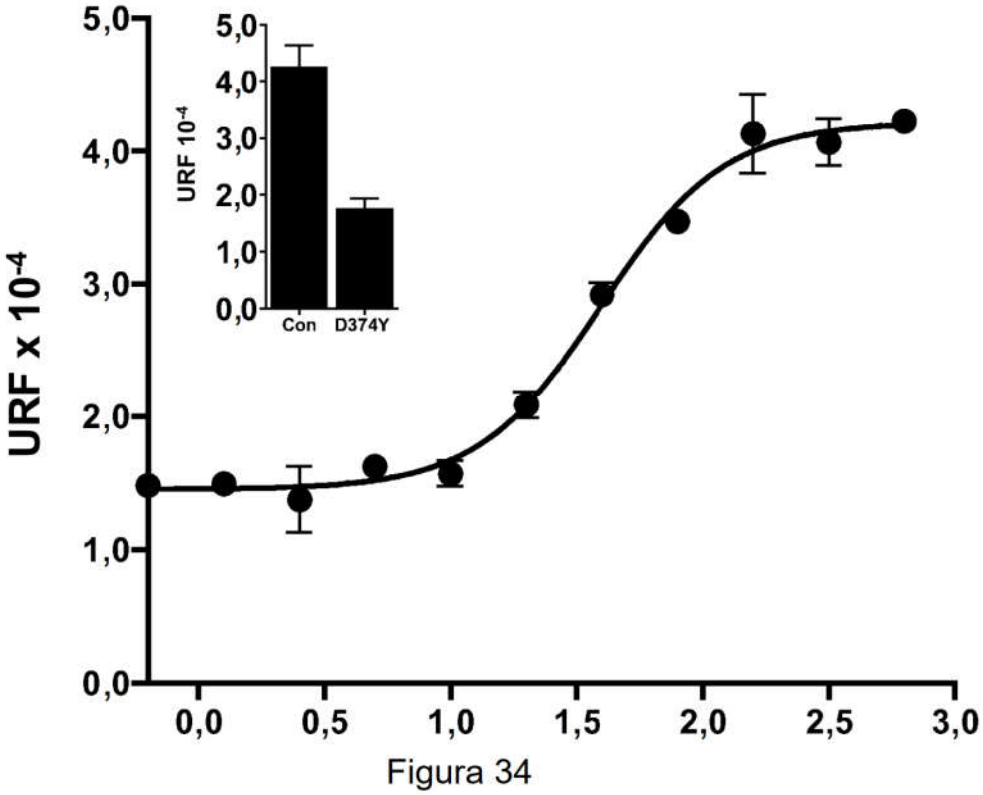

URF x 10-4
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
URF 10-4
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
Con
D374Y

Figura 34

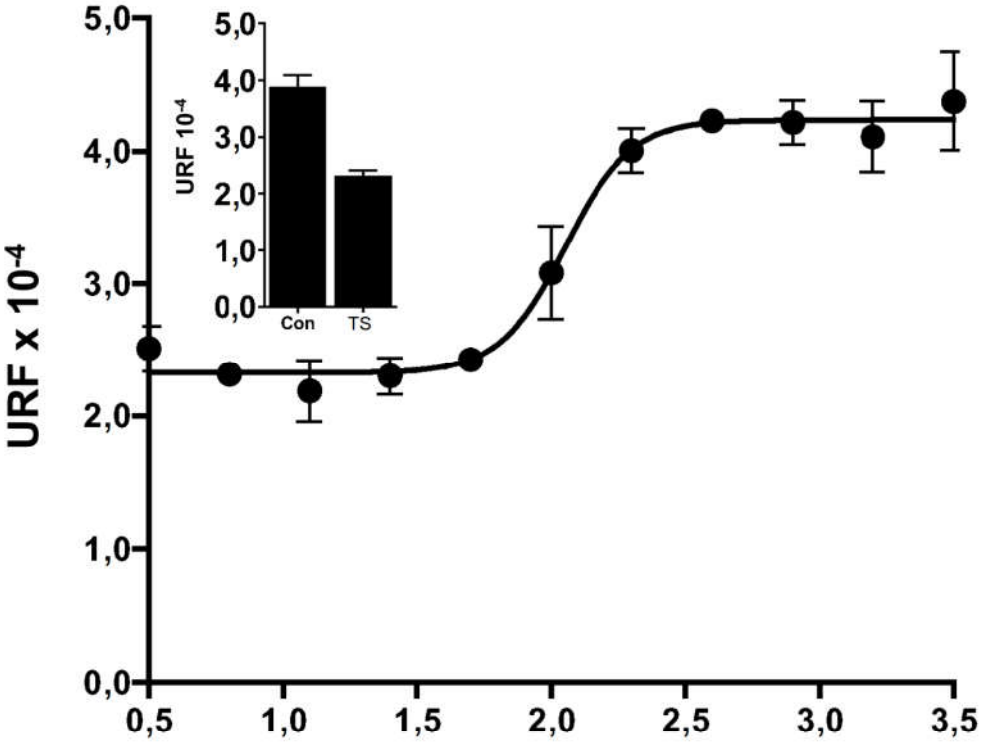


Figura 35

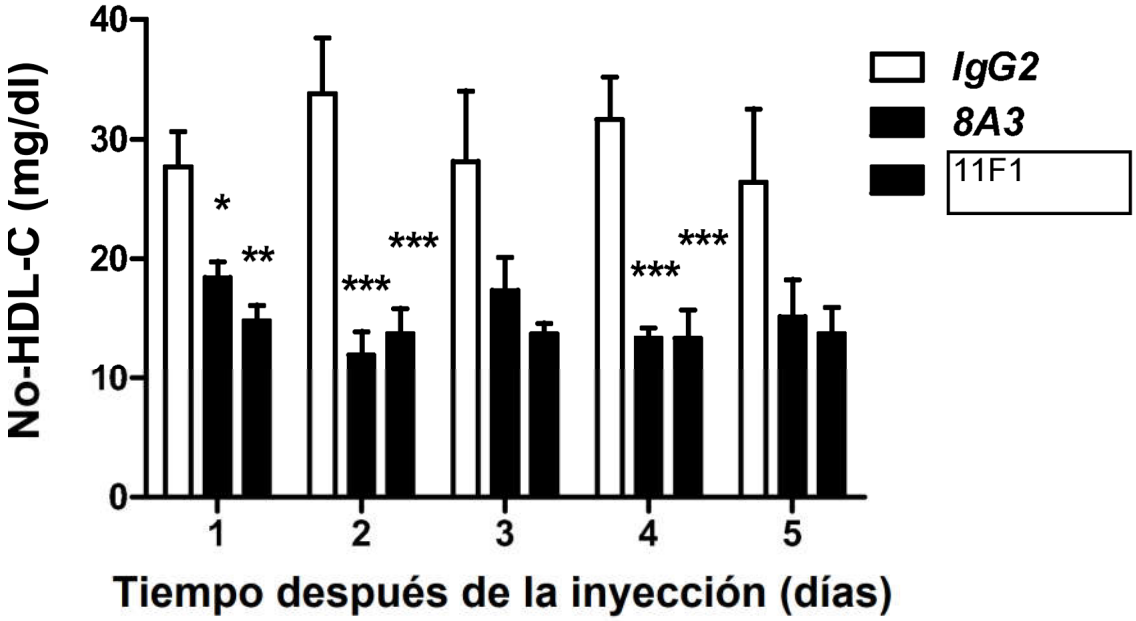

40
30
20
10
0
No-HDL-C (mg/dl)
*
**
***
***
***
***
1
2
3
4
5
Tiempo después de la inyección (días)
IgG2
8A3
11F1

Figura 36

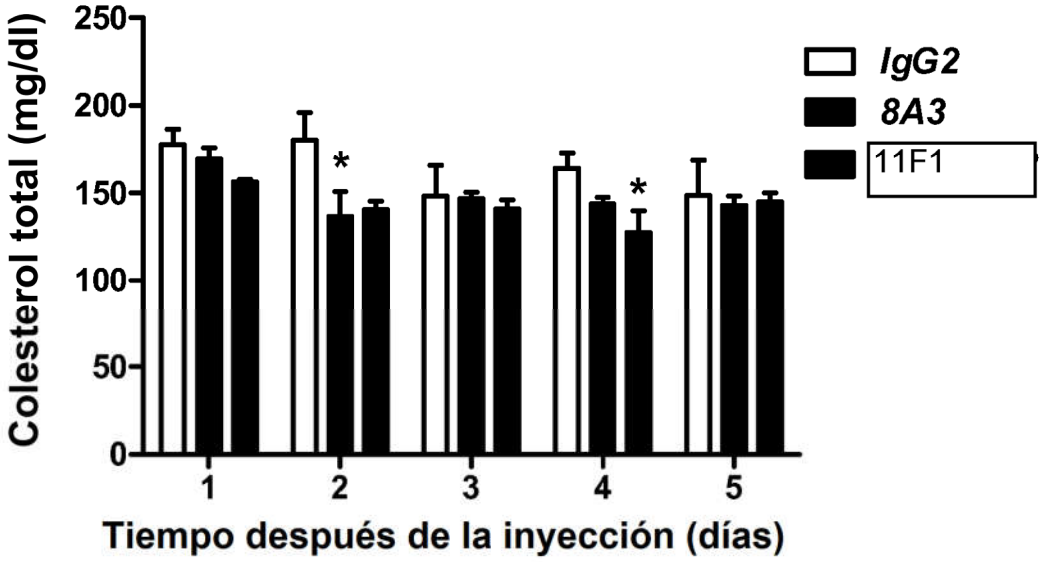

Colesterol total (mg/dl)
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
Tiempo después de la inyección (días)
IgG2
8A3
11F1
*
*

Figura 37

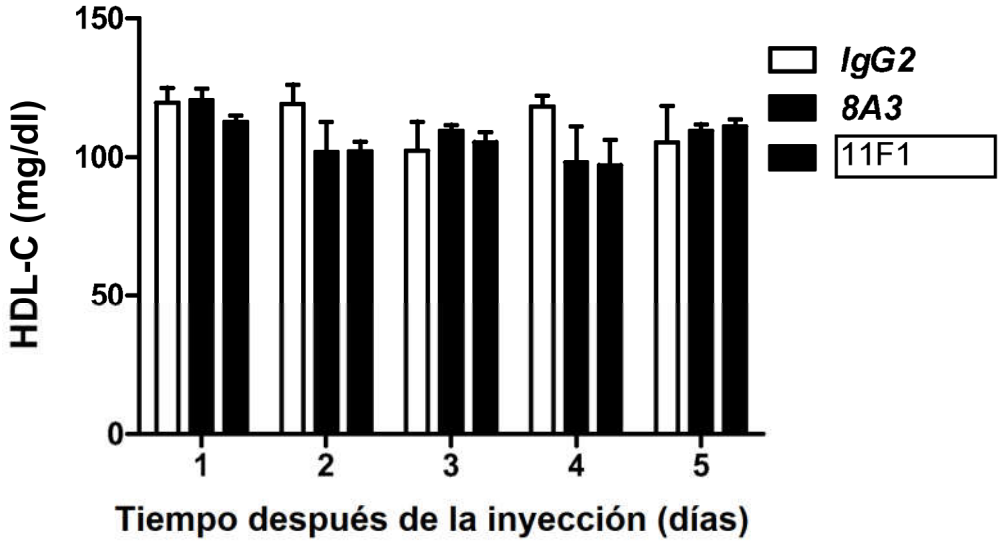

150
100
50
0
HDL-C (mg/dl)
1
2
3
4
5
Tiempo después de la inyección (días)
IgG2
8A3
11F1

Figura 38

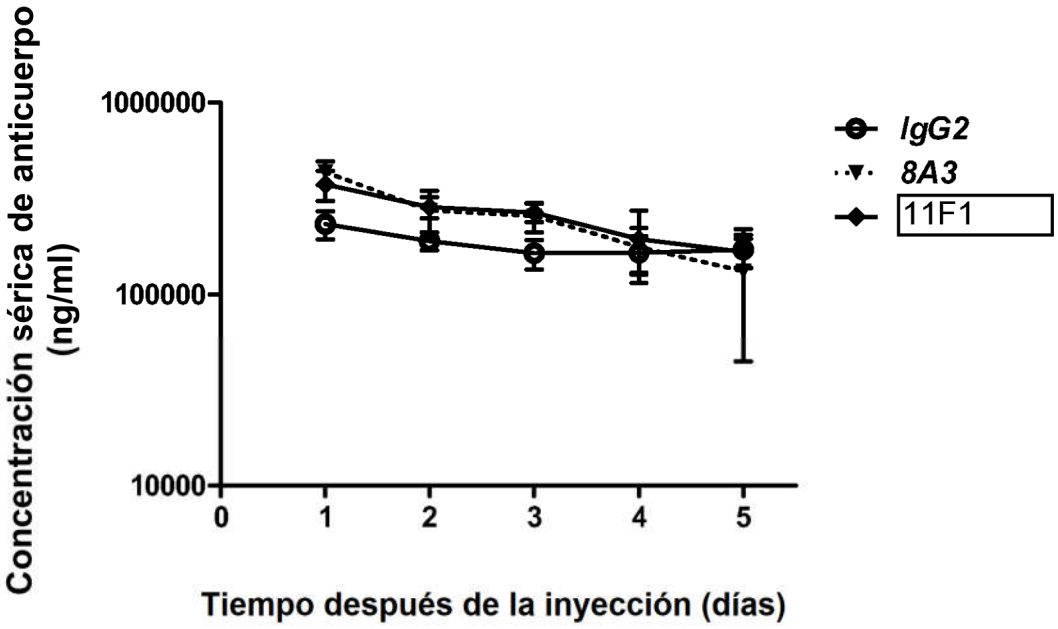

Concentración sérica de anticuerpo (ng/ml)
1000000
100000
10000
0
1
2
3
4
5
Tiempo después de la inyección (días)
IgG2
8A3
11F1

Figura 39

Anticuerpo	ABC_{0-t} (µg•h/ml)	CL_{0-t} (ml/h/kg)	$t_{1/2}$ aparente (h)
IgG2	23,500	0,511	>120
11F1	34,700	0,865	83
8A3	36,700	0,817	59

Figura 40

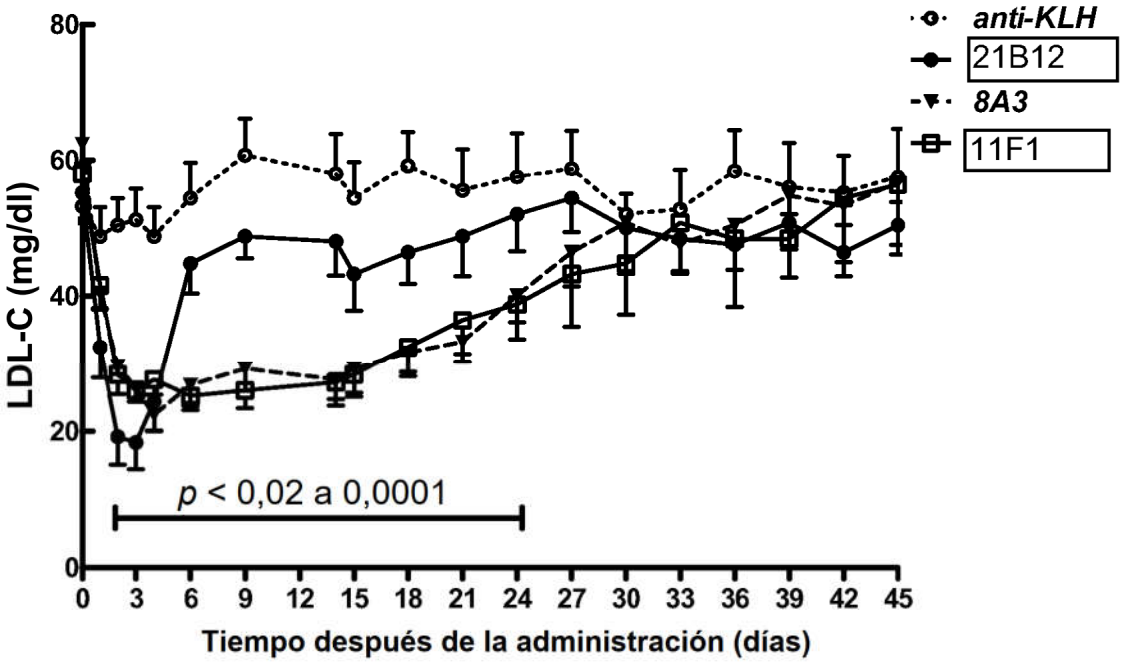

anti-KLH
21B12
8A3
11F1
LDL-C (mg/dl)
80
60
40
20
0
p < 0,02 a 0,0001
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
Tiempo después de la administración (días)

Figura 41

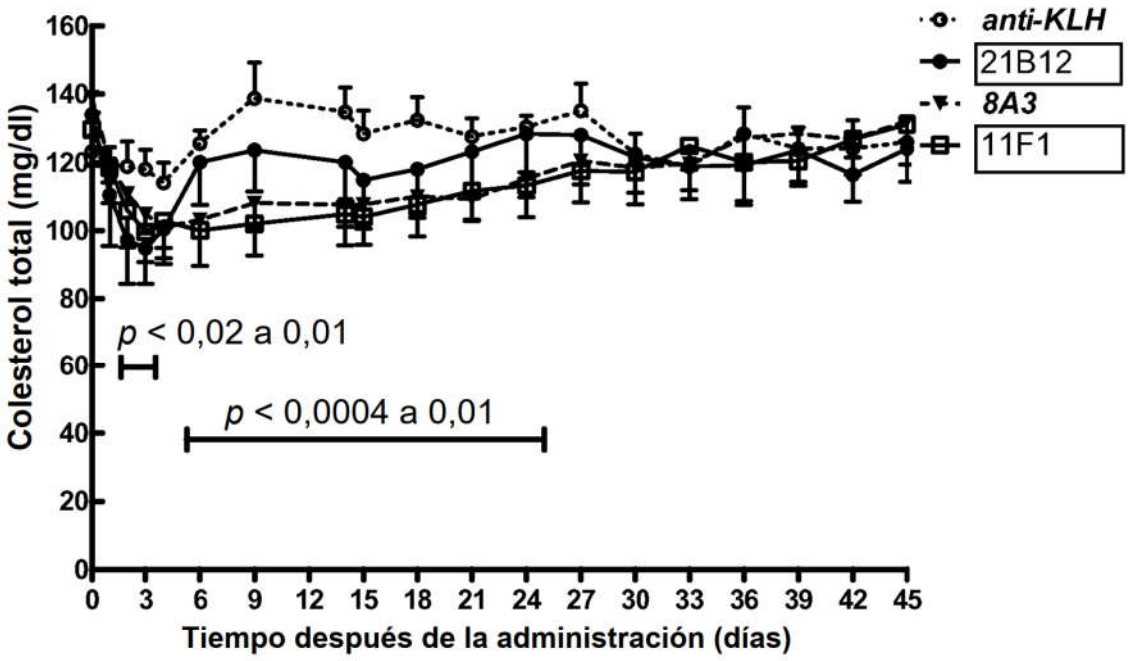

anti-KLH
21B12
8A3
11F1
Colesterol total (mg/dl)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
p < 0,02 a 0,01
p < 0,0004 a 0,01
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
Tiempo después de la administración (días)

Figura 42

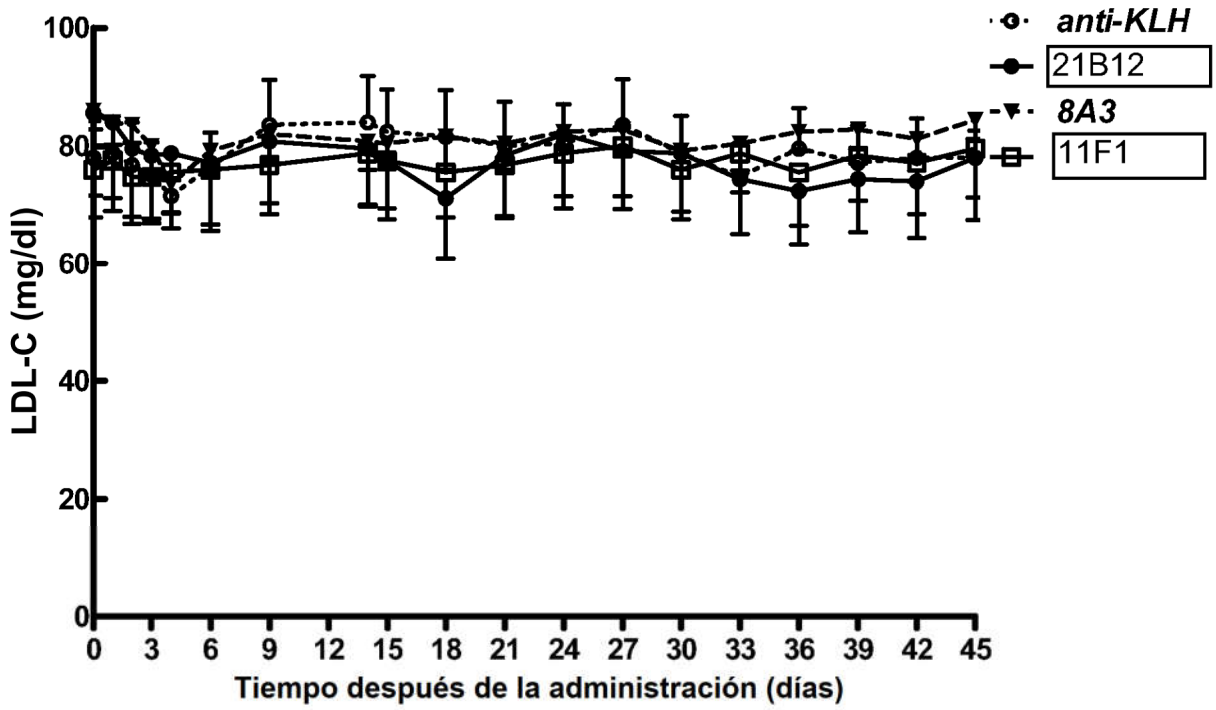

anti-KLH
21B12
8A3
11F1
LDL-C (mg/dl)
100
80
60
40
20
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
Tiempo después de la administración (días)

Figura 43

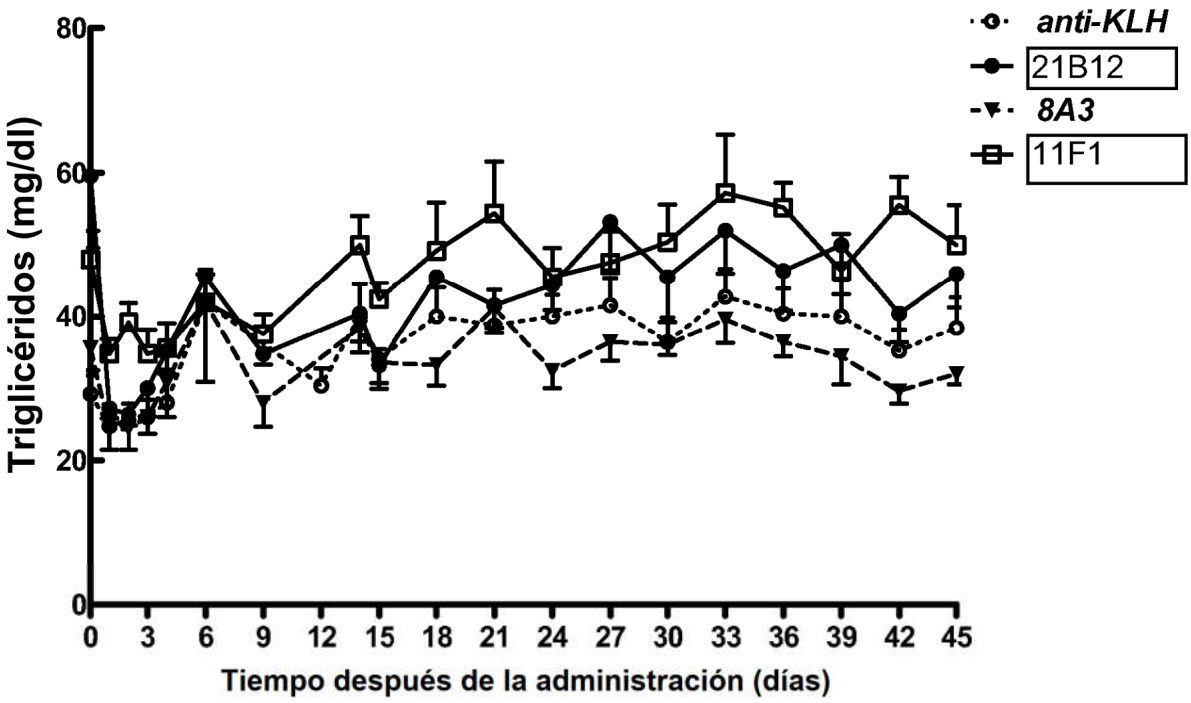

anti-KLH
21B12
8A3
11F1
Triglicéridos (mg/dl)
80
60
40
20
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36 39 42 45
Tiempo después de la administración (días)

Figura 44

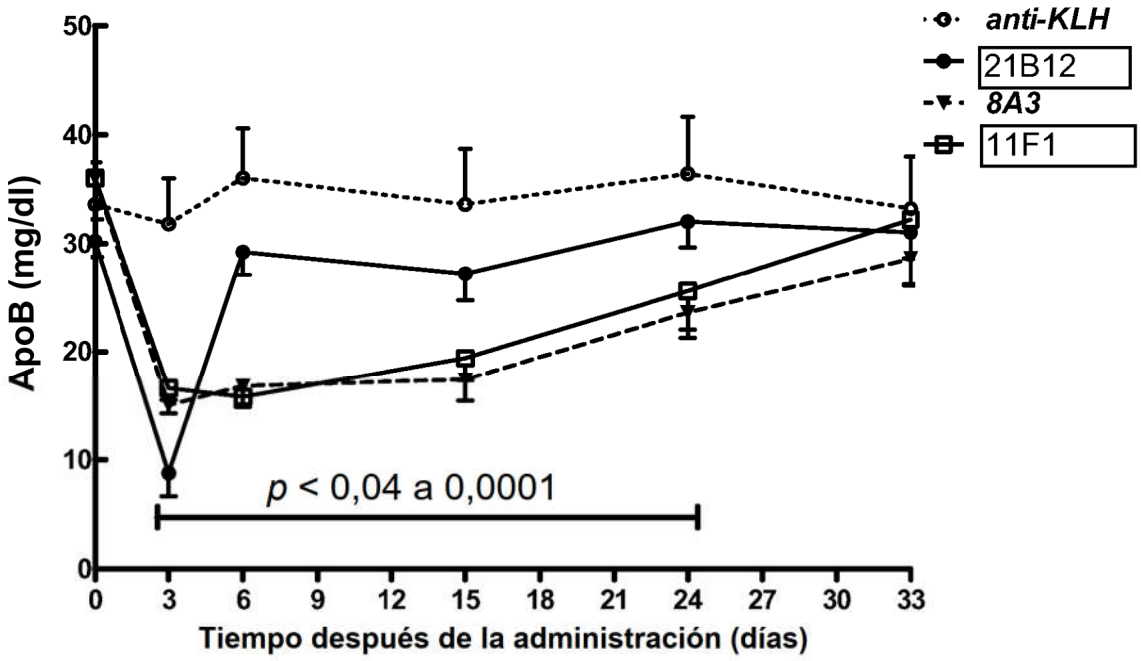

anti-KLH
21B12
8A3
11F1
ApoB (mg/dl)
50
40
30
20
10
0
p < 0,04 a 0,0001
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
Tiempo después de la administración (días)

Figura 45

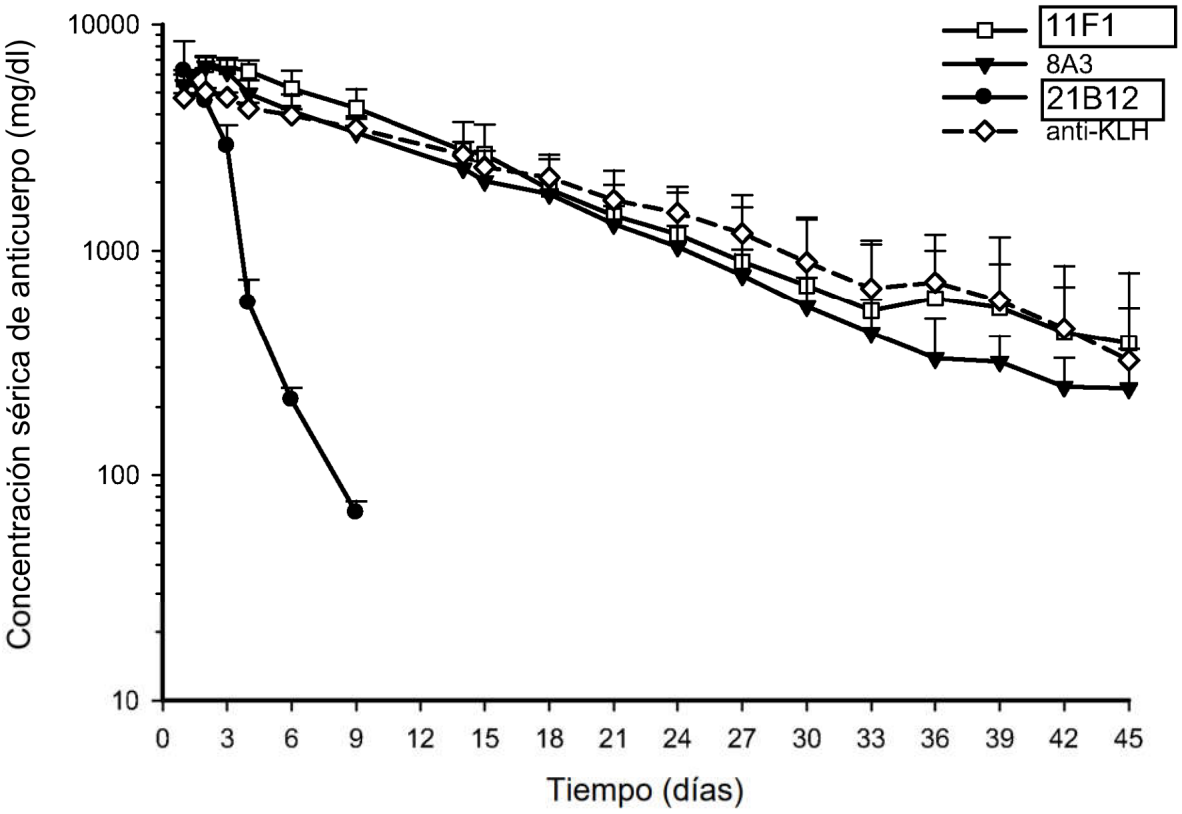

Concentración sérica de anticuerpo (mg/dl)
10000
1000
100
10
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
33
36
39
42
45
Tiempo (días)
11F1
8A3
21B12
anti-KLH

Figura 46

	Media (± DT) Parámetros farmacocinéticos			
Anticuerpo	$t_{1/2,z}$ (h)	CL/F (ml/h/kg)	Cmáx (µg/ml)	$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (µg*h/ml)
Anti-KLH	220 ± 130	0,234 ± 0,036	5,08 ± 0,15	2,170 ± 320
21B12	40 ± 6	1,57 ± 0,68	6,22 ± 2,21	355 ± 109
11F1	210 ± 110	0,228 ± 0,081	6,72 ± 0,62	2,440 ± 910
8A3	190 ± 40	0,255 ± 0,039	6,63 ± 0,66	1,990 ± 290

Figura 47