

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-037695- -00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:54:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 256

PCT
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

11-37695

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

TITULO: ANTAGONISTAS DE PCSK9

SOLICITANTE: RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION y PFIZER INC

**DIRECCIÓN: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 E.U.A.
y 235 East 42nd Street, New York, NY 10017, E. U. A.**

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 28 de Marzo de 2011

P2011/000062

12-04-2011

No. 2

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-037695- -00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:54:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 256

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2011/000062

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: RINAT NEUROSCIENCE
CORPORATION y PFIZER INC.

Dirección: 230 East Grand Avenue, South San
Francisco, CA 94080 y 235 East 42nd Street, New York,
New York 10017

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá,
Colombia

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2009/053990

Fecha

Septiembre 11, 2009

Publicación Internacional No. WO 2010/029513

Fecha

Marzo 18, 2010

6

Título (54) ANTAGONISTAS DE PCSK9

Clasificación Internacional (51)

Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	US	Septiembre 12, 2008	61/096.716
	US	Agosto 7, 2009	61/232.161
	US	Agosto 20, 2009	61/235.643

9

Comprobante de pago No. 11-

Fecha Marzo de 2011

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver Exp. N° 09-081.255

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☒

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2009/053990

3

1. Hong LIANG,
Rinat Laboratories,
Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue,
South San Francisco, CA 94080
Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

2. Yasmina Noubia ABDICHE,
Rinat Laboratories,
Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue,
South San Francisco, CA 94080
Estados Unidos.
Nacionalidad: Británica

3. Javier Fernando CHAPARRO RIGGERS,
Rinat Laboratories,
Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue,
South San Francisco, CA 94080
Estados Unidos.
Nacionalidad: Alemana

4. Bruce Charles GOMES,
Pfizer Inc. 620 Memorial Drive,
Cambridge, Massachusetts 02139
Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

5. Julie Jia Li HAWKINS,
Pfizer Global Research and Development,
Eastern Point Road, Groton, CT 06340
Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

LISTA DE INVENTORES

PCT/IB2009/053990

6. **Jaume PONS,**
Rinat Laboratories,
Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue,
South San Francisco, CA 94080
Estados Unidos.
Nacionalidad: Española

7. **QIU, Xiayang**
Pfizer Global Research and Development,
Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340
Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

8. **STROP, Pavel**
Rinat Laboratories,
Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue,
South San Francisco, CA 94080
Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

9. **WANG, Yuli**
Pfizer Global Research and Development,
10777 Science Center Drive, San Diego,
California 92121
Estados Unidos.
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0027440

Bogotá D.C., Marzo 25 de 2011 - 16:23:15

RECIBIDO DE : OLARTERAISBECK

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	418332633	25/03/2011	6.026.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-037695-00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:54:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 256

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Marzo 25 de 2011 - 16:23:16

WK 4683984



ESCRITURA PUBLICA NUMERO= = = = =
QUINIENTOS VEINTINUEVE (529) = = = = =

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los
Diez = = = = = (10) días del mes de
Mayo = = = = = de dos mil siete (2007),
ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA = =

= = = = = NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura pública que se
consigna en los siguientes términos: -----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: -----
OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA-----
NIT: 830122870-6.-----

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor de
edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, obrando en nombre y
representación OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA, con
número de identificación tributaria (NIT) 830122870-6 entidad
legalmente constituida mediante escritura pública número mil
ciento diecinueve (1119) de la notaría treinta y nueve (39) de
Bogotá del diez (10) de junio de dos mil tres (2003), como lo
acredita con el certificado de constitución y gerencia expedido por
la Cámara de Comercio de Bogotá que presenta para su
protocolización y declaró -----

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en
los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta
escritura corresponda, en seis (6) folios autenticados, un poder
con su traducción la cual es del siguiente tenor:-----

" PODER GENERAL.- -----

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

El suscrito, RINAT NEUROSCIENCES CORPORATION, domiciliado en 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA, nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center-Torre A, Calle 100 No. 8A-37, piso 10, Bogotá D.C. nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado a intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la Ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----



01



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

26 DE MARZO DE 2007

HORA 09:25:34

02DLM032606304PCT0708

HOJA : 001

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA, CON FUNDAMENTO EN LAS MATRICULAS E INSCRIPCIONES DEL REGISTRO MERCANTIL,

CERTIFICA :

NOMBRE : OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA PERO PARA TODOS LOS EFECTOS PODRA OPERAR BAJO EL NOMBRE OLARTERAISBECK

N.I.T. : 830122870-6 ADMINISTRACION: BOGOTA PERSONAS JURIDICAS, REGIMEN COMUN.

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA :

MATRICULA NO. 01284164

CERTIFICA :

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001119 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JUNIO DE 2003, INSCRITA EL 25 DE JUNIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00885810 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD COMERCIAL DENOMINADA: OR LEGAL LTDA

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001328 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 4 DE JULIO DE 2003, INSCRITA EL 9 DE JULIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00887749 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : OR LEGAL LTDA POR EL DE : OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA PERO PARA TODOS LOS EFECTOS PODRA OPERAR BAJO EL NOMBRE OLARTERAISBECK

CERTIFICA :

REFORMAS:

ESCRITURA	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	INSCRIPCION	FECHA
0001328	2003/07/04	00039	BOGOTA D.C.	00887749	2003/07/09

CERTIFICA :

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE JUNIO DE 2103 .

CERTIFICA :

OBJETO SOCIAL : LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO PRINCIPAL LA PRESTACION DE SERVICIOS DE ASESORIA EN EL AREA SOCIAL, TECNICA, COMERCIAL Y JURIDICA, DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, NACIONALES O EXTRANJERAS, PUBLICAS O PRIVADAS. EN DESARROLLO DE SU OBJETO SOCIAL PODRA : A. PRESTAR ASESORIA Y EJERCER LA REPRESENTACION JUDICIAL DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS ANTE LAS DIFERENTES JURISDICCIONES Y PARTICIPAR EN SU NOMBRE Y REPRESENTACION EN TRIBUNALES DE ARBITRAMENTO, AMIGABLE COMPOSICION, CONCILIACION Y MEDIACION. B. CONFORMAR Y PARTICIPAR EN CENTROS DE ARBITRAJE Y CONCILIACION. C. CELEBRAR Y EJECUTAR TODAS LAS OPERACIONES DE CAMBIO Y COMERCIO EXTERIOR QUE REQUIERA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA COMPAÑIA ; D. ADQUIRIR, ENAJENAR, GRAVAR, DAR O TOMAR EN ARRENDAMIENTO TODA CLASE DE BIENES, DANDO O RECIBIENDO LAS GARANTIAS DEL CASO CUANDO HAYA LUGAR A ELLAS ;

NOTARIA VENTISIETE
María Eugenia Rojas de Uribe

E. INTERVENIR COMO DEUDORA O ACREEDORA EN TODA CLASE DE OPERACIONES DE CREDITO, DANDO O RECIBIENDO LAS GARANTIAS DEL CASO CUANDO HAYA LUGAR A ELLAS ; F. CELEBRAR CON ESTABLECIMIENTOS DE CREDITO NACIONALES O EXTRANJEROS Y CON COMPAÑIAS ASEGURADORAS TODAS LAS OPERACIONES QUE SE RELACIONEN CON LOS NEGOCIOS Y BIENES SOCIALES. G. ABRIR, OPERAR Y CERRAR CUALQUIER TIPO DE CUENTAS BANCARIAS ; H. GIRAR, ACEPTAR, ENDOSAR, ASEGURAR, COBRAR, RECHAZAR, PROTESTAR, AVALAR GARANTIZAR Y NEGOCIAR EN GENERAL TODA CLASE DE INSTRUMENTOS NEGOCIABLES Y CUALQUIER OTRA CLASE DE TITULOS DE CREDITO ; I. ORGANIZAR, PROMOVER, FORMAR Y FINANCIAR SOCIEDADES O EMPRESAS NACIONALES O EXTRANJERAS QUE TIENDAN A FACILITAR, ENSANCHAR, O COMPLEMENTAR LOS NEGOCIOS SOCIALES DENTRO Y FUERA DEL PAIS Y SUSCRIBIR ACCIONES O CUOTAS EN ELLAS, Y EJERCER TODOS LOS DERECHOS Y OBLIGACIONES ECONOMICOS Y CORPORATIVOS QUE SURJAN DE DICHA PARTICIPACION. J. CREAR CONSORCIOS Y UNIONES TEMPORALES. K. SERVIR DE COMISIONISTA O INTERMEDIARIO COMERCIAL A TITULO DE CORRETAJE O A CUALQUIER OTRO TITULO ; L. SER CORRESPONSAL Y TENER CORRESPONSALES INTERNACIONALES ; M. EFECTUAR AVALUOS COMERCIALES DE TODA CLASE DE BIENES. N. ADQUIRIR Y CONSTRUIR TODA CLASE DE INSTALACIONES INDUSTRIALES O COMERCIALES COMO FABRICAS, TALLERES, ALMACENES DE DISTRIBUCION O VENTA ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO, ETC. O. DISTRIBUIR O VENDER TODO TIPO DE PRODUCTOS Y ABRIR Y ADMINISTRAR, DIRECTA O INDIRECTAMENTE, LOS ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO QUE SEAN NECESARIOS PARA ELLO. P. ENAJENAR, ARRENDAR, GRAVAR Y ADMINISTRAR EN GENERAL LOS BIENES QUE COMPONEN EL PATRIMONIO SOCIAL. Q. APORTAR SUS BIENES, EN TODO O EN PARTE, A OTRA U OTRAS SOCIEDADES A QUE LE CONVENGA VINCULARSE PARA UN MEJOR DESARROLLO DE SUS NEGOCIOS. R. TRANSIGIR, DESISTIR O SOMETER A DECISIONES ARBITRALES LAS CUESTIONES EN QUE TENGA INTERES FRENTE A TERCEROS. ; S. SOLICITAR, CONSEGUIR LOS REGISTROS RESPECTIVOS ANTE LA AUTORIDAD COMPETENTE Y EXPLOTAR EL DERECHO SOBRE MARCAS, NOMBRES COMERCIALES O CUALQUIER SIGNO DISTINTIVO, DIBUJOS, INSIGNIAS, PATENTES Y CUALQUIER OTRO DERECHO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL O INTELECTUAL YA SEA A NOMBRE DE LA SOCIEDAD O DE UN TERCERO. T. HACER PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON EL OBJETO SOCIAL. U. CELEBRAR Y EJECUTAR CON SU PROPIO NOMBRE Y POR CUENTA DE TERCEROS O EN PARTICIPACION CON ELLOS, ACTOS O CONTRATOS Y OPERACIONES EN GENERAL, TODO ACTO O CONTRATO QUE SEA NECESARIO O CONVENIENTE PARA CUMPLIR O FACILITAR LOS ACTOS Y OPERACIONES PREVISTAS EN LOS ESTATUTOS Y QUE DE MANERA DIRECTA SE RELACIONEN CON EL OBJETO SOCIAL, TAL COMO QUEDA DETERMINADO.

CERTIFICA :

CAPITAL Y SOCIOS : \$ 120,000,000.00 DIVIDIDO EN 12,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$ 10,000.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIOS CAPITALISTA(S)

FRIERI DEL CASTILLO ANA MARIA	C.C. 00045483209
NO. CUOTAS: 4,000.00	VALOR:\$40,000,000.00

RAISBECK LLINAS JAMES IAN	C.C. 00079376996
NO. CUOTAS: 4,000.00	VALOR:\$40,000,000.00

OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO	C.C. 00079782747
NO. CUOTAS: 4,000.00	VALOR:\$40,000,000.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 12,000.00	VALOR :\$120,000,000.00
-----------------------	-------------------------

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL : LA SOCIEDAD TENDRA UN GERENTE GENERAL, EL CUAL TENDRA UN PRIMER SUPLENTE Y UN SEGUNDO SUPLENTE QUE LO



01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

26 DE MARZO DE 2007

HORA 09:25:34

02DLM032606304PCT0708

HOJA : 002

REEMPLAZARA EN SUS FALTAS ABSOLUTAS, TEMPORALES O ACCIDENTALES, Y CUYA DESIGNACION Y REMOCION CORRESPONDERA TAMBIEN A LA JUNTA DE SOCIOS.

CERTIFICA :

** NOMBRAMIENTOS : **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001119 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JUNIO DE 2003, INSCRITA EL 25 DE JUNIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00885810 DEL LIBRO IX, FUE(ON) NOMBRADO(S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
GERENTE	
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO	C.C.00079782747
PRIMER SUPLENTE DEL GERENTE	
RAISBECK LLINAS JAMES IAN	C.C.00079376996
SEGUNDO SUPLENTE DEL GERENTE	
FRIERI DEL CASTILLO ANA MARIA	C.C.00045483209

CERTIFICA :

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL : EL GERENTE GENERAL ES EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA SOCIEDAD, Y EN CASO DE FALTA TEMPORAL O ABSOLUTA HARA SUS VECES EL PRIMER SUPLENTE O EN SU DEFECTO EL SEGUNDO SUPLENTE, TAMBIEN ELEGIDOS POR LA JUNTA DE SOCIOS. EL GERENTE REPRESENTARA Y COMPROMETERA A LA SOCIEDAD FRENTE A TERCEROS, SEAN PERSONAS O ENTIDADES PARTICULARES, OFICIALES O JUDICIALES. ASI MISMO, PODRA CELEBRAR EN SU NOMBRE CONTRATO DE ARRENDAMIENTO COMO ARRENDADOR O ARRENDATARIO. CONSTITUIR APODERADOS DE LA SOCIEDAD, DESISTIR, INTERPONER TODA CLASE DE RECURSOS RECIBIR DINERO EN MUTUO, HACER DEPOSITOS BANCARIOS O DE CUALQUIER OTRA INDOLE, FIRMAR TITULOS VALORES Y NEGOCIARLOS, TENERLOS, CONTRATARLOS, PAGARLOS, ENDOSARLOS, DESCARGARLOS, CELEBRAR CONTRATOS COMERCIALES, EJECUTAR LOS ACUERDOS DE LA JUNTA DE SOCIOS Y CONVOCARLA A REUNIONES ORDINARIAS O EXTRAORDINARIAS, SUSCRIBIR CONTRATOS LABORALES A NOMBRE DE LA SOCIEDAD, Y EN GENERAL TODAS LAS GESTIONES QUE OBEDEZCAN A LA NATURALEZA DE SU ENCARGO Y QUE SE RELACIONEN DIRECTAMENTE CON EL GIRO ORDINARIO DE LOS NEGOCIOS SOCIALES. EL GERENTE REQUERIRA APROBACION DE LA JUNTA DE SOCIOS PARA CELEBRAR ACTOS CUYA CUANTIA SEA O EXCEDA LA SUMA DE DIEZ MILLONES DE PESOS (\$10,000,000) MONEDA CORRIENTE.

CERTIFICA :

** REVISOR FISCAL: **

QUE POR ACTA NO. 0000006 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 5 DE MARZO DE 2004, INSCRITA EL 8 DE JULIO DE 2004 BAJO EL NUMERO 00942232 DEL LIBRO IX, FUE(ON) NOMBRADO(S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL	
LACHE NUÑEZ JOSE LUCIO	C.C.00006763005

CERTIFICA :

DIRECCION DE NOTIFICACION JUDICIAL : CLL 100 NO 8A-37 P 10 W.T.C.

REVISOR FISCAL
LACHE NUÑEZ JOSE LUCIO
BOGOTA, COLOMBIA

T A

MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

DIRECCION COMERCIAL : CLL 100 NO 8A-37 P 10 W.T.C. T A

MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

E-MAIL : ELIZABETH.BARBOSA@OLARTERAISBECK.COM

CERTIFICA :

QUE LA SOCIEDAD TIENE MATRICULADOS LOS SIGUIENTES ESTABLECIMIENTOS :

NOMBRE : OR LEGAL LIMITADA

MATRICULA NO. 01284255

RENOVACION DE LA MATRICULA : EL 27 DE MARZO DE 2006

ULTIMO AÑO RENOVADO : 2006

CERTIFICA :

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

INFORMACION COMPLEMENTARIA

LOS SIGUIENTES DATOS SOBRE RIT Y PLANEACION DISTRITAL SON INFORMATIVOS

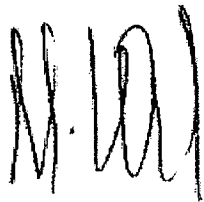
CONTRIBUYENTE INSCRITO EN EL REGISTRO RIT DE LA DIRECCION DISTRITAL DE IMPUESTOS, FECHA DE INSCRIPCION 2003/06/24

FECHA DE ENVIO DE INFORMACION A PLANEACION DISTRITAL: 10 DE JULIO DE 2004

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

VALOR : \$ 3,000.00

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES.



A
9

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO CUYO ORIGINAL ESTÁ EN INGLÉS

Nota adjunta:

560686 - Estado de New York - Condado de New York

Yo, Norman Goodman, Registrador del Condado y Registrador de la Corte Suprema, Condado de New York, la cual es una Corte de Registro, poseedor por ley de un sello, certifico por medio del presente documento que (...), ante o por quien fue firmado el registro anexo, era en la fecha del mismo un Notario Público de la ciudad en y para el Condado de New York, debidamente comisionado, juramentado y cualificado para actuar como tal. Que de acuerdo con la ley, una comisión o un certificado de su carácter oficial, con su firma autógrafa ha sido archivado en mi oficina; que al momento de tomar dicha prueba, reconocimiento o juramento, ella estaba debidamente autorizada para tomar la (lo); que estoy bien familiarizado con la firma de dicho funcionario o he comparado su firma con la depositada en mi oficina por lo cual creo que la firma en el registro adjunto es genuina.

Como constancia de lo anterior, he puesto aquí mi firma y el sello oficial este 19 de Abril de 2007.

(Firmado): Norman Goodman – Registrador del Condado y Registrador de la Corte Suprema, Condado de New York.

Sello redondo sobre esta nota: "Condado de New York"

NOTARIO PÚBLICO
Marta Eugenia Rojas de Linde


Traductor Oficial
JORGE A. SERRA REYES
Licencia 374 - 1993 Minjusticia

Apostilla adjunta:

Estado de Florida Departamento de Estado APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Norman Goodman
3. Actuando en calidad de:	Registrador del Condado
4. Lleva el sello/estampilla de:	Condado de New York
<u>Certificado</u>	
5. En:	New York, New York
6. El:	1º de Mayo de 2007.
7. Por:	Sub Secretario Especial del Estado, Estado de New York.
8. Bajo el No.:	NYC-10256048B
9. Sello seco / estampilla:	==
10. Firma:	James Bizzarri Sub Secretario Especial del Estado

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto:

Título: "Apostilla New Y."

Fecha: 8 de Mayo de 2007.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 218-2308, (57-1) 623-2925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 9859

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

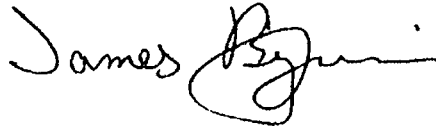
Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: **United States of America**
- This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York 6. the 01st day of May 2007
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10256048B
9. Seal/Stamp 10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

10-8

SECRET
Marta L. Rojas de Cueta

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

General Power

The undersigned,

domiciled in

230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA
hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

Signature/Firma:


Grover F. Fuller Jr., Attorney-in-Fact

Date/Fecha:

27 February 2007

City/Country:

New York, New York 10017 USA

Poder General

El suscrito,

domiciliado en

230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA
nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas
Alexander Agadelo
Camilo A. Rodríguez

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncalcano

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date, 27th February 2007

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

I. That

1. Que

GROVER F. FULLER JR.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

150 EAST 42ND STREET, NEW YORK, NEW YORK 10017 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as ATTORNEY-IN-FACT

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3. That RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

4. Que

having its principal place of business located in 230 East Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, USA

con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

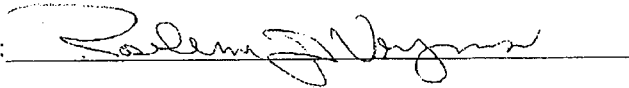
4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): POWER OF ATTORNEY dated 18 July 2006 (expiring on 18 July 2009)

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):



ROSELAINE J. VERGNIAUD
Notary Public State of New York
No. 01VE6011435
Qualified in Queens County
Certificate Filed in New York County
Commission Expires August 10, 2010

NOTARY PUBLIC

Maria Eugenia Rojas de Urzeta



State of New York
County of New York, } ss.:

560686

Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal,
DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

NC

Arnellain Vignarone
whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

APR 19 2007

FEE PAID \$3.00

Norman Goodman
County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

WK 4683985



Firma (ilegible) Grover F. Fuller JR.,
Attorney-in-fact -----

Fecha: 27 February 2007.-----

City Country: New York, New York
10017 USA.-----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha,-----

el Notario Público suscrito certifica:-----

1. Que GROVER F. FULLER JR, mayor de edad y domiciliado 150
EAST 42nd STREET, NEW YORK, NEW YORK 10017 USA suscribió
el documento que antecede. -----

2- Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su
carácter de -----

4. Que ----- con sede principal ubicada en.-----
está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y
que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra
dentro de los que comprenden su objeto social. -----

4.- Que el otorgante tiene la representación para suscribir el
poder, y que ésta es legítima.-----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos
2, 3, y 4 fue la exhibición de (los) (del) siguiente(s) documento(s).
auténtico(s): (fdo. ilegible) ROSELAINE J. VERGNIAUD Notary
Public Of New York No. 01VE6011435 Qualified in Queens Country
Certificate Filed in New York Country Comisión Expires August
10.2010.-----

TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO CUYO ORIGINAL
ESTA EN INGLES.-----

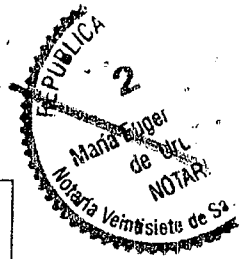
Nota adjunta: -----

560686- Estado de New York.-----

Yo, Normas Goodman, Registrador del condado y Registrador de
la Cortes Suprema, Condado de New York, la cual es una Corte de
Registro, poseedor por ley de un sello, certifico pro medio del

NOTARIA VENTISIETE

Maria Eugenia Rojas de Urueña



presente documento que (...), ante o por quien fue firmado el registro anexo, era en la fecha del mismo un notario Público de la ciudad en y para el Condado de New York, debidamente comisionado, juramentado y cualificado para actuar como tal. Que de acuerdo con la ley, una comisión o un certificado de su carácter oficial, con su firma autógrafa ha sido archivado en mi oficina; que al momento de tomar dicha prueba, reconocimiento o juramento, ella estaba debidamente autorizada para tomar la (lo); que estoy familiarizado con la firma de dicho funcionario o he comparado su firma con la depositada en mi oficina por lo cual creo que la firma en el registro adjunto es genuina.-----

Como constancia de lo anterior, he puesto aquí mi firma y el sello oficial este 19 de Abril de 2007.-----

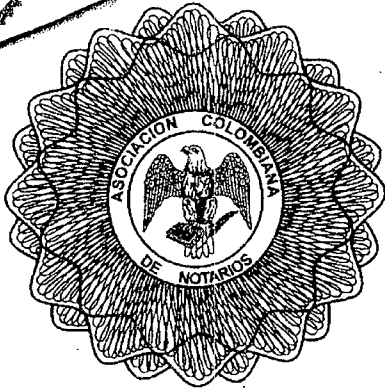
(Firmado): Norman Goodman- Registrador del Condado y Registrador de la Corte Suprema, Condado de New York. Sello redondo sobre esta nota: "Condado de New York".-----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dicho documentos al protocolo de ésta notaría para que de su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

WK

4683986



ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y
AUTORIZACION.- Leído el presente
instrumento por el (los) compareciente
(s) y advertido (s) sobre las
formalidades legales, lo aprueban y
firman conmigo y ante mi la(el)

Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió
finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el)
Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la
forma y casos previstos por la Ley. ---Se utilizaron las hojas de
papel Notarial Nos WK 4683984, WK 4683985, WK 4683986 = = = = =

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00

RESOLUCION 7880 DE 2006

IVA \$ 13.787.00

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79782.747 Bogotá

TEL: 601-7700

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUELA

NOTARIA(O)-VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.

VENTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

Es fiel y Segunda ^{2ª}
fotocopia de la Escritura Pública No. 529
de fecha 10 de Mayo de 2007
tomada de su original que expido en
Ocho (8) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 11 MAYO 2007

El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá



ESPACIO EN BLANCO

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
PFIZER INC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejerce funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

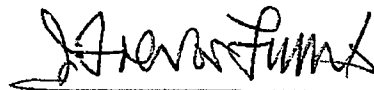
The undersigned,

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Signature/Firma:



Date/Fecha: July 14, 2003

City, Country/Ciudad, País: New York, USA

Poder

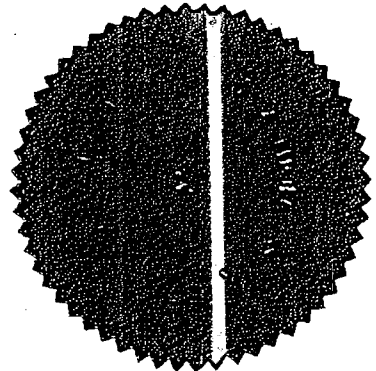
El suscrito,

Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in New York, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant General Patent Counsel
of Pfizer Inc.

3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in
New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

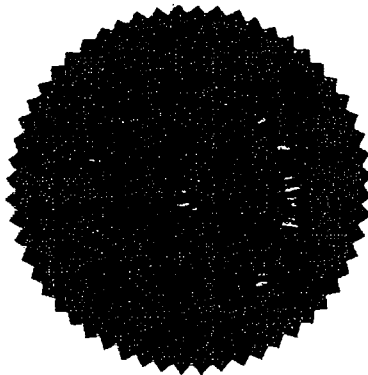
EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey

This 14th

Day Of July

2003

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord
This public document / Le présent acte public
2. Has been signed by **K Greenwood**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de
5. at London/à Londres
6. Certified/Attesté
the/le 17 July 2003
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **G210434**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **R. Bawden**



For the Secretary of State : Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
18 March 2010 (18.03.2010)



PCT



(10) International Publication Number
WO 2010/029513 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/IB2009/053990

(22) International Filing Date:
11 September 2009 (11.09.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/096,716 12 September 2008 (12.09.2008) US
61/232,161 7 August 2009 (07.08.2009) US
61/235,643 20 August 2009 (20.08.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION** [US/US]; 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **LIANG, Hong** [US/US]; Rinat Laboratories, Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **ABDICHE, Yasmina Noubia** [GB/US]; Rinat Laboratories, Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue, South San Francisco, 94080 (US). **CHAPARRO RIGGERS, Javier Fernando** [DE/US]; Rinat Laboratories, Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue, South San Francisco, 94080 (US). **GOMES, Bruce Charles** [US/US]; Pfizer Inc. 620 Memorial Drive, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **HAWKINS, Julie Jia Li** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US). **PONS, Jaume** [ES/US]; Rinat Laboratories, Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94040 (US). **QIU, Xiayang** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340 (US). **STROP, Pavel** [US/US]; Rinat Laboratories, Pfizer Inc. 230, East Grand Avenue, South San

Francisco, California 94080 (US). **WANG, Yuli** [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 10777 Science Center Drive, San Diego, California 92121 (US).

(74) Agent: **KLEIMAN, Gabriel L.**; 235 East 42nd Street, New York, New York 10017 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: PCSK9 ANTAGONISTS

(57) Abstract: The present invention provides antagonizing antibodies, antigen-binding portions thereof, and aptamers that bind to proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9). Also provided are antibodies directed to peptides, in which the antibodies bind to PCSK9. The invention further provides a method of obtaining such antibodies and antibody-encoding nucleic acid. The invention further relates to therapeutic methods for use of these antibodies and antigen-binding portions thereof to reduce LDL-cholesterol levels and/or for the treatment and/or prevention of cardiovascular disease, including treatment of hypercholesterolemia.

WO 2010/029513 A2

PCSK9 ANTAGONISTS

Field of the Invention

The present invention relates to antibodies, e.g., full length antibodies or antigen-binding portions thereof, peptides, and aptamers that antagonize the activity of extracellular proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9), including its interaction with the low density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR). More specifically, the invention relates to compositions comprising antagonist PCSK9 antibodies, peptides, and/or aptamers and methods of using these antibodies and/or peptides and/or aptamers as a medicament. The antagonist PCSK9 antibodies, peptides, and aptamers can be used therapeutically to lower LDL-cholesterol levels in blood, and can be used in the prevention and/or treatment of cholesterol and lipoprotein metabolism disorders, including familial hypercholesterolemia, atherogenic dyslipidemia, atherosclerosis, and, more generally, cardiovascular disease (CVD).

Background of the Invention

Millions of people in the U.S. are at risk for heart disease and resulting cardiac events. CVD and underlying atherosclerosis is the leading cause of death among all demographic groups, despite the availability of therapies directed at its multiple risk factors. Atherosclerosis is a disease of the arteries and is responsible for coronary heart disease associated with many deaths in industrialized countries. Several risk factors for coronary heart disease have now been identified: dyslipidemias, hypertension, diabetes, smoking, poor diet, inactivity and stress. The most clinically relevant and common dyslipidemias are characterized by an increase in beta-lipoproteins (very low density lipoprotein (VLDL) and LDL) with hypercholesterolemia in the absence or presence of hypertriglyceridemia (Fredrickson et al., 1967, N Engl J Med. 276:34-42, 94-103, 148-156, 215-225, and 273-281). There is a long-felt significant unmet need with respect to CVD with 60-70% of cardiovascular events, heart attacks and strokes occurring despite the treatment with statins (the current standard of care in atherosclerosis). Moreover, new guidelines suggest that even lower LDL levels should be achieved in order to protect high risk patients from premature CVD [National Cholesterol Education Program (NCEP), 2004].

PCSK9, also known as NARC-1, was identified as a protein with a genetic mutation in some forms of familial hypercholesterolemia. PCSK9 is synthesized as a zymogen that undergoes autocatalytic processing at the motif LVFAQ in the endoplasmic reticulum. Population studies have shown that some PCSK9 mutations are "gain-of-function" and are found in individuals with autosomal dominant hypercholesterolemia, while other "loss-of-function" (LOF) mutations are linked with reduced plasma cholesterol. Morbidity and mortality studies in this group clearly demonstrated that reducing PCSK9 function significantly diminished the risk of cardiovascular disease.

Of significant importance to the treatment of CVD, a LOF mutation may sensitize humans to statins, allowing for efficacy at a lower dose (hence, improving risks associated with safety and tolerance) and potentially achieving lower plasma cholesterol levels than with current therapies.

PCSK9 is secreted into the plasma predominantly by hepatocytes. Genetic modulation of PCSK9 in mice confirmed the ability of PCSK9 to regulate blood lipids, and suggested that it acts to down-regulate hepatic LDLR protein levels.

The mechanism by which, and the site at which, PCSK9 down-regulates LDLR protein has not been clearly established. When over-expressed, PCSK9 may act both within the hepatocyte and as a secreted ligand for LDLR. There is strong evidence that extracellular PCSK9 binds to cell surface LDLR and promotes LDLR degradation at an intracellular site. However, it is also possible that PCSK9 could interact with the LDLR when the two proteins are translated within the endoplasmic reticulum (ER) and traffic through endosomal compartments towards the cell membrane. Maxwell et al., 2005, Curr. Opin. Lipidol. 16:167-172, showed that PCSK9-mediated LDLR endocytosis and degradation was not altered by proteasome inhibitors nor was it modulated by different classes of lysosomal and nonlysosomal proteases. Two naturally occurring familial hypercholesterolemia mutations, S127R and D129G, have been reported to be defective in autoprocessing and secretion as levels of these mutant proteins were greatly reduced or undetectable in the media of transfected cells. Yet these mutants demonstrated an enhanced ability to down-regulate LDLR, consistent with their identification in individuals with high plasma LDL (Homer et al., 2008, Atherosclerosis 196:659-666; Cameron et al., 2006 Human Molecular Genetics 15:1551-1558; Lambert et al., 2006, TRENDS in Endocrinology and Metabolism 17:79-81. Since these mutants

apparently do not get secreted extracellularly, and yet do downregulate LDLR, this strongly suggests that an intracellular site of action is physiologically important.

From the information available in the art, and prior to the present invention, it remained unclear whether the introduction of an antibody-, peptide-, or aptamer- based PCSK9 antagonist into the blood circulation to selectively antagonize extracellular PCSK9 would be effective to reduce hypercholesterolemia and the associated incidence of CVD and, if so, what properties of a PCSK9 antagonist are needed for such in vivo effectiveness.

10 Summary of the Invention

This invention relates to antagonist antibodies, peptides, and aptamers that selectively interact with and inhibit PCSK9 function. It is demonstrated for the first time that certain PCSK9 antagonists are effective in vivo to lower blood cholesterol.

In one embodiment, the invention provides an isolated antagonist of PCSK9 which comprises an antibody, a peptide, or an aptamer, which interacts with PCSK9 and when administered to a subject lowers the LDL-cholesterol level in blood of said subject. The antagonist can be an antibody, for example, a monoclonal antibody or human, humanized, or chimeric antibody.

In another embodiment, the invention provides an isolated anti-PCSK9 antibody which specifically binds to PCSK9 and which is a full antagonist of the PCSK9-mediated effect on LDLR levels when measured in vitro using the LDLR down regulation assay in Huh7 cells disclosed herein.

In yet another embodiment, the invention provides an isolated antibody which antagonizes the extracellular interaction of PCSK9 with the LDLR, as measured by PCSK9 binding to the LDLR in vitro, and, when administered to a subject, lowers the LDL-cholesterol level in blood of said subject. Preferably, the antibody recognizes an epitope on human PCSK9 that overlaps with more than about 75% of the surface on PCSK9 that interacts with the EGF-like domain of the LDLR as described in Kwon et al., 2008, PNAS, 105:1820-1825.

In yet another embodiment, the invention provides an antibody that recognizes a first epitope of PCSK9 that overlaps with a second epitope that is recognized by a monoclonal antibody selected from the group consisting of 5A10, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned

accession number PTA-8986; 4A5, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession number PTA-8985; 6F6, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession number PTA-8984, and 7D4, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession number PTA-8983.

10 In another embodiment, the invention provides an antibody to human PCSK9, wherein the antibody recognizes an epitope on human PCSK9 comprising amino acid residues 153-155, 194, 195, 197, 237-239, 367, 369, 374-379 and 381 of the PCSK9 amino acid sequence of SEQ ID NO: 53. Preferably, the antibody epitope on human PCSK9 does not comprise one or more of amino acid residues 71, 72, 150-152, 187-192, 198-202, 212, 214-217, 220-226, 243, 255-258, 317, 318, 347-351, 372, 373, 380, 382, and 383.

15 In still another embodiment, the invention provides an antibody which specifically binds PCSK9 comprising a VH complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:8 (SYVMH), a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:9 (EISPFGGRTNYNEKFKS), and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10 (ERPLYASDL), or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in said sequences of CDR1, CDR2, and/or CDR3, wherein the variant retains essentially the same binding specificity as the CDR defined by said sequences. Preferably, the variant comprises up to about ten amino acid substitutions and, more preferably, up to about four amino acid substitutions.

25 The invention is further directed to an antibody comprising a VL CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:11 (RASQGISSALA), a CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12 (SASYRYT), and/or CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:13 (QQRYSLWRT), or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in said sequences of CDR1, CDR2, and/or CDR3, wherein the variant retains essentially the same binding specificity as the CDR1 defined by said sequences. Preferably, the variant comprises up to about ten amino acid substitutions and, more preferably, up to about four amino acid substitutions.

In another embodiment, the invention provides an antibody comprising specific VL CDR1, CDR2, and/or CDR3 sequences, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3 and further comprising a VH complementary determining region CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:59, 60, or 8, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:61 or 9, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in said sequences of CDR1, CDR2, and/or CDR3, wherein the variant retains essentially the same binding specificity as the CDR1, CDR2, and/or CDR3 defined by said sequences. Preferably, the variant comprises up to about twenty amino acid substitutions and, more preferably, up to about eight amino acid substitutions. In another preferred embodiment, the antibody of the invention has a variable heavy chain sequence comprising or consisting of SEQ ID NO: 54 and a variable light chain sequence comprising or consisting of SEQ ID NO: 53.

The invention also provides a humanized antibody comprising polypeptides selected from the groups consisting of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, or both SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in said sequences, wherein the variant retains essentially the same binding specificity as the antibody defined by said sequence(s). It also includes an antibody lacking a terminal lysine on the heavy chain, as this is normally lost in a proportion of antibodies during manufacture.

Preferably, the variant comprises up to about twenty amino acid substitutions and more preferably, up to about eight amino acid substitutions. Preferably, the antibody further comprises an immunologically inert constant region, and/or the antibody has an isotype that is selected from the group consisting of IgG₂, IgG₄, IgG_{2Δa}, IgG_{4Δb}, IgG_{4Δc}, IgG₄ S228P, IgG_{4Δb} S228P and IgG_{4Δc} S228P. In another preferred embodiment, the constant region is aglycosylated Fc.

In one embodiment, the invention provides a method for reducing a level of LDL, LDL-cholesterol, or total cholesterol in blood, serum, or plasma of a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an antagonist of the invention.

In one embodiment, the invention provides a therapeutically effective amount of an antagonist of the invention for use in reducing a level of LDL, LDL-cholesterol, or

total cholesterol in blood, serum, or plasma of a subject in need thereof. The invention further provides the use of a therapeutically effective amount of an antagonist of the invention in the manufacture of a medicament for reducing a level of LDL, LDL-cholesterol, or total cholesterol in blood, serum, or plasma of a subject in need thereof.

5 In yet another embodiment, the invention provides a method of preparing an antibody which specifically binds PCSK9, which comprises: a) providing a PCSK9-negative host animal; b) immunizing said PCSK9-negative host animal with PCSK9; and c) obtaining an antibody. An antibody-producing cell, or an antibody-encoding nucleic acid from said PCSK9-negative host animal, and preparing an antibody from
10 said antibody-producing cell or said antibody-encoding nucleic acid.

The invention also comprises a method for reducing the level of LDL in blood of a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody prepared according to the invention. The subject can be further treated by administering a statin. In a preferred embodiment, the subject is a
15 human subject.

In one embodiment, the antibody is administered in a formulation as a sterile aqueous solution having a pH that ranges from about 5.0 to about 6.5 and comprising from about 1 mg/ml to about 200 mg/ml of antibody, from about 1 millimolar to about 100 millimolar of histidine buffer, from about 0.01 mg/ml to about 10 mg/ml of
20 polysorbate 80, from about 100 millimolar to about 400 millimolar of trehalose, and from about 0.01 millimolar to about 1.0 millimolar of disodium EDTA dihydrate.

In another embodiment, the invention provides a therapeutically effective amount of the antibody prepared according to the invention for use in reducing the level of LDL in blood of a subject in need thereof. The invention further provides the use of a
25 therapeutically effective amount of the antibody prepared according to the invention in the manufacture of a medicament for reducing the level of LDL in blood of a subject in need thereof. The therapeutically effective amount can optionally be combined with a therapeutically effective amount of a statin.

In another embodiment, the invention provides a hybridoma cell line that
30 produces a PCSK9-specific antibody or an antigen-binding portion thereof, wherein the hybridoma cell line is selected from the group consisting of:

4A5 having an ATCC Accession No. of PTA-8985;

5A10 having an ATCC Accession No. of PTA-8986;

6F6 having an ATCC Accession No. of PTA-8984; and
7D4 having an ATCC Accession No. of PTA-8983.

In another embodiment, the invention provides cell line that recombinantly produces an antibody which specifically binds to PCSK9 and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:8, 59, or 60, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:9 or 61, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3, and/or comprises a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:11, a VL CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12, and/or VL CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:13, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3. Preferably, the cell line recombinantly produces an antibody comprising SEQ ID NO: 53 and/or 54, and, more preferably, SEQ ID NO: 14 and/or 15.

Brief Description of the Figures/Drawings

Figure 1 illustrates the effect of anti-PCSK9 antagonistic monoclonal antibodies 7D4.4, 4A5.G3, 6F6.G10.3 and 5A10.B8 on the ability of mouse PCSK9 (A) and human PCSK9 (B) to down regulate LDLR in cultured Huh7 cells. 6F6.G10.3 is a subclone of 6F6, 7D4.4 is a subclone of 7D4, 4A5.G3 is a subclone of 4A5, and 5A10.B8 is a subclone of 5A10.

Figure 2 illustrates the dose-response of anti-PCSK9 antagonist monoclonal antibodies 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3, 5A10.B8, negative control antibody 42H7, and PBS to block the binding of recombinant biotinylated human PCSK9 (A) and mouse PCSK9 (B) to immobilized recombinant LDLR extracellular domain in vitro.

Figure 3 illustrates the dose-response of anti-PCSK9 monoclonal antagonist antibodies 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3 and 5A10.B8 to block binding of recombinant biotinylated human PCSK9 (30 nM) to Europium labeled recombinant LDLR extracellular domain (10 nM) in solution at neutral pH in vitro.

Figure 4 illustrates comparative epitope binding of anti-PCSK9 antibodies.

Figure 5 illustrates Western blots of binding of anti-PCSK9 antibodies to serum PCSK9 from different species.

Figure 6 illustrates the effect of anti-PCSK9 monoclonal antibody 7D4 on blood cholesterol levels in mice.

Figure 7 illustrates (A) the effect of a partial antagonist polyclonal anti-PCSK9 mAb CRN6 on LDLR down regulation and (B) the lack of effect on cholesterol levels in mice.

Figure 8 illustrates the time course of the cholesterol lowering effect obtained using anti-PCSK9 antagonist antibody 7D4 in mice.

Figure 9 illustrates the dose dependence of the anti-PCSK9 antagonist mAb 7D4 on the reduction of serum total cholesterol, HDL and LDL in mice.

Figure 10 illustrates the dose dependence of the cholesterol lowering effect of anti-PCSK9 antagonist antibody 5A10 in mice.

Figure 11 illustrates the dose dependence of the cholesterol lowering effect of anti-PCSK9 antagonist antibodies (A) 4A5 and (B) 6F6 in mice.

Figure 12 depicts Western blots of anti-PCSK9 antagonist antibodies effect on liver LDLR levels.

Figure 13 illustrates the lack of effect of anti-PCSK9 antagonist antibody 4A5 in an LDLR-/- mouse model.

Figure 14 illustrates the effect on total serum cholesterol of multiple administrations of anti-PCSK9 antagonist antibodies in mice over a longer time course than seen with a single dose.

Figure 15 illustrate the time course of the effects of anti-PCSK9 antagonistic antibody 7D4 on lipid parameters in a cynomolgus monkey model.

Figure 16 illustrates the dose- and time- response of anti-PCSK9 antagonistic antibody 7D4 on serum cholesterol levels in the cynomolgus monkey.

Figure 17 illustrates a comparison of anti-PCSK9 antagonistic antibodies 4A5, 5A10, 6F6 and 7D4 on serum cholesterol levels in the cynomolgus monkey.

Figure 18 illustrates the time course of the effect of anti-PCSK9 antagonist antibody 7D4 on plasma cholesterol levels of cynomolgus monkeys fed a 33.4% kcal fat diet supplemented with 0.1% cholesterol.

Figure 19 illustrates the effect of L1L3 (humanized anti-PCSK9 monoclonal antibody) on down regulation of LDLR in Huh7 cells.

Figure 20 illustrates the dose-response of L1L3 humanized antibody, the mouse precursor 5A10, and negative control antibody 42H7 on blocking the binding of

recombinant biotinylated human PCSK9 (A and B) and mouse PCSK9 (C and D) to immobilized recombinant LDLR extracellular domain in vitro at pH 7.5 (A and C) and pH 5.3 (B and D).

Figure 21 illustrates the effect on serum cholesterol of treatment of mice with 10 mg/kg L1L3.

Figure 22 illustrates the effect of administration of 5A10 antibody or L1L3 to cynomolgus monkeys and measurement of changes in serum HDL (A) and serum LDL (B) as a function of time.

Figure 23A depicts the crystal structure of the PCSK9 (light gray surface representation) bound to the L1L3 antibody (black cartoon representation). Figure 23B depicts the crystal structure of the PCSK9 (light gray surface representation) bound to the EGF-like domain of the LDLR (black cartoon representation) (Kwon et al., PNAS, 105, 1820-1825, 2008). Figure 23C shows the surface area representation of PCSK9 with the L1L3 epitope shown in dark gray. Figure 23D shows the surface area representation of PCSK9 with the LDLR EGF-like domain epitope shown in dark gray.

Figures 24 A-G depict the substitutions made in the CDRs of antibody 5A10 in the course of affinity maturation and optimization and to achieve particular properties. PCSK9 binding associated with antibodies having these CDR substitutions is also represented. The number following each sequence is the SEQ ID NO designated for each sequence.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to antibodies, peptides, and aptamers that antagonize the function of extracellular PCSK9 including its interaction with the LDLR. More specifically, the invention relates to methods of making antagonist PCSK9 antibodies, peptides, and aptamers, compositions comprising these antibodies, peptides, and/or aptamers, and methods of using these antibodies, peptides, and/or aptamers as a medicament. The antagonist PCSK9 antibodies and peptides can be used to lower blood LDL-cholesterol levels, and can be used in the prevention and/or treatment of cholesterol and lipoprotein metabolism disorders, including familial hypercholesterolemia, atherogenic dyslipidemia, atherosclerosis, and, more generally, CVD.

General Techniques

19
21

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definitions

25 An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')₂, Fv),
30 single chain (ScFv) and domain antibodies), and fusion proteins comprising an antibody portion, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site. An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any

particular class. Depending on the antibody amino acid sequence of the constant domain of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

As used herein, "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, or may be made by recombinant DNA methods such as described in U.S. Pat. No. 4,816,567. The monoclonal antibodies may also be isolated from phage libraries generated using the techniques described in McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554, for example.

As used herein, "humanized" antibody refers to forms of non-human (e.g., murine) antibodies that are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Preferably, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are

replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences, but are included to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Preferred are antibodies having Fc regions modified as described in WO 99/58572. Other forms of humanized antibodies have one or more CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, and/or CDR H3) which are altered with respect to the original antibody, which are also termed one or more CDRs "derived from" one or more CDRs from the original antibody.

As used herein, "human antibody" means an antibody having an amino acid sequence corresponding to that of an antibody that can be produced by a human and/or which has been made using any of the techniques for making human antibodies known to those skilled in the art or disclosed herein. This definition of a human antibody includes antibodies comprising at least one human heavy chain polypeptide or at least one human light chain polypeptide. One such example is an antibody comprising murine light chain and human heavy chain polypeptides. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art. In one embodiment, the human antibody is selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies (Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Human antibodies can also be made by immunization of animals into which human immunoglobulin loci have been transgenically introduced in place of the endogenous loci, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. This approach is described in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016. Alternatively, the human antibody may be prepared by immortalizing human B lymphocytes that produce an antibody directed against a target antigen (such B lymphocytes may be recovered from an individual or may have been

immunized in vitro). See, e.g., Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; and U.S. Patent No. 5,750,373.

5 A "variable region" of an antibody refers to the variable region of the antibody light chain or the variable region of the antibody heavy chain, either alone or in combination. As known in the art, the variable regions of the heavy and light chain each consist of four framework regions (FR) connected by three complementarity determining regions (CDRs) that contain hypervariable regions. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the CDRs from the other chain,
10 contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies. There are at least two techniques for determining CDRs: (1) an approach based on cross-species sequence variability (i.e., Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Al-lazikani et al, 1997, J.
15 Molec. Biol. 273:927-948). As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by either approach or by a combination of both approaches.

As known in the art a "constant region" of an antibody refers to the constant region of the antibody light chain or the constant region of the antibody heavy chain, either alone or in combination.

20 As used herein, the term "PCSK9" refers to any form of PCSK9 and variants thereof that retain at least part of the activity of PCSK9. Unless indicated differently, such as by specific reference to human PCSK9, PCSK9 includes all mammalian species of native sequence PCSK9, e.g., human, canine, feline, equine, and bovine. One exemplary human PCSK9 is found as Uniprot Accession Number Q8NBP7 (SEQ ID
25 NO:16).

As used herein, a "PCSK9 antagonist" refers to an antibody, peptide, or aptamer that is able to inhibit PCSK9 biological activity and/or downstream pathway(s) mediated by PCSK9 signaling, including PCSK9-mediated down-regulation of the LDLR, and PCSK9-mediated decrease in LDL blood clearance. A PCSK9 antagonist antibody
30 encompasses antibodies that block, antagonize, suppress or reduce (to any degree including significantly) PCSK9 biological activity, including downstream pathways mediated by PCSK9 signaling, such as LDLR interaction and/or elicitation of a cellular response to PCSK9. For purpose of the present invention, it will be explicitly

understood that the term "PCSK9 antagonist antibody" encompasses all the previously identified terms, titles, and functional states and characteristics whereby the PCSK9 itself, a PCSK9 biological activity (including but not limited to its ability to mediate any aspect of interaction with the LDLR, down regulation of LDLR, and decreased blood LDL clearance), or the consequences of the biological activity, are substantially nullified, decreased, or neutralized in any meaningful degree. In some embodiments, a PCSK9 antagonist antibody binds PCSK9 and prevents interaction with the LDLR. Examples of PCSK9 antagonist antibodies are provided herein.

As used herein a "full antagonist" is an antagonist which, at an effective concentration, essentially completely blocks a measurable effect of PCSK9. By a partial antagonist is meant an antagonist that is capable of partially blocking a measurable effect, but that, even at a highest concentration is not a full antagonist. By essentially completely is meant at least about 80%, preferably, at least about 90%, more preferably, at least about 95%, and most preferably, at least about 98% or 99% of the measurable effect is blocked. The relevant "measurable effects" are described herein and include down regulation of LDLR by a PCSK9 antagonist as assayed in Huh7 cells in vitro, in vivo decrease in blood (or plasma) levels of total cholesterol, and in vivo decrease in LDL levels in blood (or plasma).

As used herein, the term "clinically meaningful" means at least a 15% reduction in blood LDL-cholesterol levels in humans or at least a 15% reduction in total blood cholesterol in mice. It is clear that measurements in plasma or serum can serve as surrogates for measurement of levels in blood.

As used herein, the term "PCSK9 antagonist peptide" or "PCSK9 antagonist aptamer" includes any conventional peptide or polypeptide or aptamer that blocks, antagonizes, suppresses or reduces (to any degree including significantly) PCSK9 biological activity, including downstream pathways mediated by PCSK9 signaling, such as LDLR interaction and/or elicitation of a cellular response to PCSK9. PCSK9 antagonist peptides or polypeptides include Fc fusions comprising the LDLR and soluble portions of the LDLR, or mutants thereof with higher affinity to PCSK9.

The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to chains of amino acids of any length, preferably, relatively short (e.g., 10-100 amino acids). The chain may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and/or may be interrupted by non-amino acids. The

terms also encompass an amino acid chain that has been modified naturally or by intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides
5 containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), as well as other modifications known in the art. It is understood that the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

As known in the art, "polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to chains of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The
10 nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a chain by DNA or RNA polymerase. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the chain. The sequence of
15 nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component. Other types of modifications include, for example, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl
20 phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals,
25 etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated
30 to solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known

in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose, carbocyclic sugar analogs, alpha- or beta-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and abasic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S("thioate"), P(S)S ("dithioate"), (O)NR₂ ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂ ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

A "PCSK9 antagonist aptamer," which comprises a nucleic acid or protein sequence, is, for example, selected from a large pool of random sequences and specifically binds PCSK9. The nucleic acid of the aptamer is double-stranded DNA or single-strand RNA. Nucleic acid aptamers can include modified bases or functional groups, including but not limited to 2'-fluorine nucleotides and 2'-O-methyl nucleotides. Aptamers can include hydrophilic polymers, for example, polyethylene glycol. Aptamers may be made by methods known in the art and selected for PCSK9 antagonist activity by routine modification of the methods disclosed in the Examples.

As used herein, an antibody, peptide, or aptamer "interacts with" PCSK9 when the equilibrium dissociation constant is equal to or less than 20 nM, preferably less than about 6 nM, more preferably less than about 1 nM, most preferably less than about 0.2 nM, as measured by the methods disclosed herein in Example 2.

An epitope that "preferentially binds" or "specifically binds" (used interchangeably herein) to an antibody or a polypeptide is a term well understood in the art, and methods to determine such specific or preferential binding are also well known in the art. A molecule is said to exhibit "specific binding" or "preferential binding" if it reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration and/or with greater affinity with a particular cell or substance than it does with alternative cells or substances. An antibody "specifically binds" or "preferentially binds" to a target if it binds with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other substances. For example, an antibody that specifically or preferentially binds to

a PCSK9 epitope is an antibody that binds this epitope with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other PCSK9 epitopes or non-PCSK9 epitopes. It is also understood by reading this definition that, for example, an antibody (or moiety or epitope) that specifically or preferentially binds to a first target
5 may or may not specifically or preferentially bind to a second target. As such, "specific binding" or "preferential binding" does not necessarily require (although it can include) exclusive binding. Generally, but not necessarily, reference to binding means preferential binding.

As used herein, "substantially pure" refers to material which is at least 50% pure
10 (i.e., free from contaminants), more preferably, at least 90% pure, more preferably, at least 95% pure, yet more preferably, at least 98% pure, and most preferably, at least 99% pure.

A "host cell" includes an individual cell or cell culture that can be or has been a recipient for vector(s) for incorporation of polynucleotide inserts. Host cells include
15 progeny of a single host cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. A host cell includes cells transfected in vivo with a polynucleotide(s) of this invention.

As known in the art, the term "Fc region" is used to define a C-terminal region of
20 an immunoglobulin heavy chain. The "Fc region" may be a native sequence Fc region or a variant Fc region. Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The numbering of the residues in the Fc region is that of the EU index
25 as in Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. The Fc region of an immunoglobulin generally comprises two constant domains, CH2 and CH3.

As used in the art, "Fc receptor" and "FcR" describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR.
30 Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have

similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9:457-92; Capel et al., 1994, Immunomethods, 4:25-34; and de Haas et al., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41. "FcR" also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., 1976 J. Immunol., 117:587; and Kim et al., 1994, J. Immunol., 24:249).

The term "compete", as used herein with regard to an antibody, means that a first antibody, or an antigen-binding portion thereof, binds to an epitope in a manner sufficiently similar to the binding of a second antibody, or an antigen-binding portion thereof, such that the result of binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the binding of the first antibody in the absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective epitope. However, where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said to "cross-compete" with each other for binding of their respective epitope(s). Both competing and cross-competing antibodies are encompassed by the present invention. Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (e.g., steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof), the skilled artisan would appreciate, based upon the teachings provided herein, that such competing and/or cross-competing antibodies are encompassed and can be useful for the methods disclosed herein.

By an antibody with an epitope that "overlaps" with another (second) epitope or with a surface on PCSK9 that interacts with the EGF-like domain of the LDLR is meant the sharing of space in terms of the PCSK9 residues that are interacted with. To calculate the percent of overlap, for example, the percent overlap of the claimed antibody's PCSK9 epitope with the surface of PCSK9 which interacts with the EGF-like domain of the LDLR, the surface area of PCSK9 buried when in complex with the LDLR is calculated on a per-residue basis. The buried area is also calculated for these residues in the PCSK9:antibody complex. To prevent more than 100% possible

overlap, surface area for residues that have higher buried surface area in the PCSK9:antibody complex than in LDLR:PCSK9 complex is set to values from the LDLR:PCSK9 complex (100%). Percent surface overlap is calculated by summing over all of the LDLR:PCSK9 interacting residues and is weighted by the interaction area.

5 A "functional Fc region" possesses at least one effector function of a native sequence Fc region. Exemplary "effector functions" include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; phagocytosis; down-regulation of cell surface receptors (e.g., B cell receptor), etc. Such effector functions generally require the Fc region to be combined
10 with a binding domain (e.g., an antibody variable domain) and can be assessed using various assays known in the art for evaluating such antibody effector functions.

A "native sequence Fc region" comprises an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of an Fc region found in nature. A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue
15 of at least one amino acid modification, yet retains at least one effector function of the native sequence Fc region. Preferably, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc region or to the Fc region of a parent polypeptide, e.g., from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably, from about one to about five amino acid substitutions in a native sequence
20 Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% sequence identity with a native sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, and most preferably, at least about 90% sequence identity therewith, more preferably, at least about 95%, at least about 96%, at least about 97%, at least about 98%, at least about 99% sequence
25 identity therewith.

As used herein, "treatment" is an approach for obtaining beneficial or desired clinical results. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, one or more of the following: enhancement of LDL clearance and reducing incidence or amelioration of aberrant cholesterol and/or
30 lipoprotein levels resulting from metabolic and/or eating disorders, or including familial hypercholesterolemia, atherogenic dyslipidemia, atherosclerosis, and, more generally, cardiovascular disease (CVD).

“Reducing incidence” means any of reducing severity (which can include reducing need for and/or amount of (e.g., exposure to) other drugs and/or therapies generally used for this condition. As is understood by those skilled in the art, individuals may vary in terms of their response to treatment, and, as such, for example, a “method of reducing incidence” reflects administering the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer based on a reasonable expectation that such administration may likely cause such a reduction in incidence in that particular individual.

“Ameliorating” means a lessening or improvement of one or more symptoms as compared to not administering a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer.

“Ameliorating” also includes shortening or reduction in duration of a symptom.

As used herein, an “effective dosage” or “effective amount” of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to effect any one or more beneficial or desired results. For prophylactic use, beneficial or desired results include eliminating or reducing the risk, lessening the severity, or delaying the outset of the disease, including biochemical, histological and/or behavioral symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. For therapeutic use, beneficial or desired results include clinical results such as reducing hypercholesterolemia or one or more symptoms of dyslipidemia, atherosclerosis, CVD, or coronary heart disease, decreasing the dose of other medications required to treat the disease, enhancing the effect of another medication, and/or delaying the progression of the disease of patients. An effective dosage can be administered in one or more administrations. For purposes of this invention, an effective dosage of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to accomplish prophylactic or therapeutic treatment either directly or indirectly. As is understood in the clinical context, an effective dosage of a drug, compound, or pharmaceutical composition may or may not be achieved in conjunction with another drug, compound, or pharmaceutical composition. Thus, an “effective dosage” may be considered in the context of administering one or more therapeutic agents, and a single agent may be considered to be given in an effective amount if, in conjunction with one or more other agents, a desirable result may be or is achieved.

An “individual” or a “subject” is a mammal, more preferably, a human. Mammals also include, but are not limited to, farm animals, sport animals, pets, primates, horses, dogs, cats, mice and rats.

As used herein, "vector" means a construct, which is capable of delivering, and, preferably, expressing, one or more gene(s) or sequence(s) of interest in a host cell. Examples of vectors include, but are not limited to, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, plasmid, cosmid or phage vectors, DNA or RNA expression vectors
5 associated with cationic condensing agents, DNA or RNA expression vectors encapsulated in liposomes, and certain eukaryotic cells, such as producer cells.

As used herein, "expression control sequence" means a nucleic acid sequence that directs transcription of a nucleic acid. An expression control sequence can be a promoter, such as a constitutive or an inducible promoter, or an enhancer. The
10 expression control sequence is operably linked to the nucleic acid sequence to be transcribed.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" or "pharmaceutical acceptable excipient" includes any material which, when combined with an active ingredient, allows the ingredient to retain biological activity and is non-reactive with the
15 subject's immune system. Examples include, but are not limited to, any of the standard pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as oil/water emulsion, and various types of wetting agents. Preferred diluents for aerosol or parenteral administration are phosphate buffered saline (PBS) or normal (0.9%) saline. Compositions comprising such carriers are formulated by well known
20 conventional methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing, 2000).

The term " k_{on} ", as used herein, refers to the rate constant for association of an antibody to an antigen. Specifically, the rate constants (k_{on} and k_{off}) and equilibrium
25 dissociation constants are measured using Fab antibody fragments (i.e., univalent) and PCSK9.

The term " k_{off} ", as used herein, refers to the rate constant for dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term " K_D ", as used herein, refers to the equilibrium dissociation constant of
30 an antibody-antigen interaction.

A. Methods for preventing or treating disorders associated with hypercholesterolemia

In one aspect, the invention provides a method for treating or preventing hypercholesterolemia, and/or at least one symptom of dyslipidemia, atherosclerosis, CVD or coronary heart disease, in an individual comprising administering to the individual an effective amount of a PCSK9 antagonist antibody or peptide or aptamer that antagonizes circulating PCSK9.

In a further aspect, the invention provides an effective amount of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer that antagonizes circulating PCSK9 for use in treating or preventing hypercholesterolemia, and/or at least one symptom of dyslipidemia, atherosclerosis, CVD or coronary heart disease, in an individual. The invention further provides the use of an effective amount of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer that antagonizes extracellular or circulating PCSK9 in the manufacture of a medicament for treating or preventing hypercholesterolemia, and/or at least one symptom of dyslipidemia, atherosclerosis, CVD or coronary heart disease, in an individual.

Advantageously, therapeutic administration of the antibody, peptide, or aptamer results in lower blood cholesterol and/or lower blood LDL. Preferably, blood cholesterol and/or blood LDL is at least about 10% or 15% lower than before administration. More preferably, blood cholesterol and/or blood LDL is at least about 20% lower than before administration of the antibody. Yet more preferably, blood cholesterol and/or blood LDL is at least 30% lower than before administration of the antibody. Advantageously, blood cholesterol and/or blood LDL is at least 40% lower than before administration of the antibody. More advantageously, blood cholesterol and/or blood LDL is at least 50% lower than before administration of the antibody. Very preferably, blood cholesterol and/or blood LDL is at least 60% lower than before administration of the antibody. Most preferably, blood cholesterol and/or blood LDL is at least 70% lower than before administration of the antibody.

With respect to all methods described herein, reference to PCSK9 antagonist antibodies, peptides, and aptamers also include compositions comprising one or more additional agents. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art. The present invention can be used alone or in combination with other conventional methods of treatment.

The PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer can be administered to an individual via any suitable route. It should be apparent to a person skilled in the art that the examples described herein are not intended to be limiting but to be illustrative of the techniques available. Accordingly, in some embodiments, the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer is administered to an individual in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, transdermal, subcutaneous, intra-articular, sublingually, intrasynovial, via insufflation, intrathecal, oral, inhalation or topical routes. Administration can be systemic, e.g., intravenous administration, or localized. Commercially available nebulizers for liquid formulations, including jet nebulizers and ultrasonic nebulizers are useful for administration. Liquid formulations can be directly nebulized and lyophilized powder can be nebulized after reconstitution. Alternatively, PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer can be aerosolized using a fluorocarbon formulation and a metered dose inhaler, or inhaled as a lyophilized and milled powder.

In one embodiment, a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer is administered via site-specific or targeted local delivery techniques. Examples of site-specific or targeted local delivery techniques include various implantable depot sources of the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer or local delivery catheters, such as infusion catheters, indwelling catheters, or needle catheters, synthetic grafts, adventitial wraps, shunts and stents or other implantable devices, site specific carriers, direct injection, or direct application. See, e.g., PCT Publ. No. WO 00/53211 and U.S. Patent No. 5,981,568.

Various formulations of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer may be used for administration. In some embodiments, the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer may be administered neat. In some embodiments, PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer and a pharmaceutically acceptable excipient may be in various formulations. Pharmaceutically acceptable excipients are known in the art, and are relatively inert substances that facilitate administration of a pharmacologically effective substance. For example, an excipient can give form or consistency, or act as a diluent. Suitable excipients include but are not limited to stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying osmolarity, encapsulating agents, buffers, and skin penetration enhancers. Excipients as well as

formulations for parenteral and nonparenteral drug delivery are set forth in Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

These agents can be combined with pharmaceutically acceptable vehicles such as saline, Ringer's solution, dextrose solution, and the like. The particular dosage regimen, i.e., dose, timing and repetition, will depend on the particular individual and that individual's medical history.

PCSK9 antibodies can also be administered via inhalation, as described herein. Generally, for administration of PCSK9 antibodies, an initial candidate dosage can be about 2 mg/kg. For the purpose of the present invention, a typical daily dosage might range from about any of about 3 µg/kg to 30 µg/kg to 300 µg/kg to 3 mg/kg, to 30 mg/kg, to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For example, dosage of about 1 mg/kg, about 2.5 mg/kg, about 5 mg/kg, about 10 mg/kg, and about 25 mg/kg may be used. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of symptoms occurs or until sufficient therapeutic levels are achieved, for example, to reduce blood LDL levels. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial dose of about 2 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 1 mg/kg of the PCSK9 antibody, or followed by a maintenance dose of about 1 mg/kg every other week. However, other dosage regimens may be useful, depending on the pattern of pharmacokinetic decay that the practitioner wishes to achieve. For example, in some embodiments, dosing from one to four times a week is contemplated. In other embodiments dosing once a month or once every other month or every three months is contemplated. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays. The dosing regimen (including the PCSK9 antagonist(s) used) can vary over time.

For the purpose of the present invention, the appropriate dosage of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer will depend on the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer (or compositions thereof) employed, the type and severity of symptoms to be treated, whether the agent is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the agent, the patient's blood PCSK9 levels, the patient's synthesis and clearance rate for PCSK9, the patient's clearance rate for the administered agent, and the discretion of the attending physician. Typically the clinician will administer a PCSK9 antagonist antibody, peptide,

or aptamer until a dosage is reached that achieves the desired result. Dose and/or frequency can vary over course of treatment. Empirical considerations, such as the half-life, generally will contribute to the determination of the dosage. For example, antibodies that are compatible with the human immune system, such as humanized
5 antibodies or fully human antibodies, may be used to prolong half-life of the antibody and to prevent the antibody being attacked by the host's immune system. Frequency of administration may be determined and adjusted over the course of therapy, and is generally, but not necessarily, based on treatment and/or suppression and/or amelioration and/or delay of symptoms, e.g., hypercholesterolemia. Alternatively,
10 sustained continuous release formulations of PCSK9 antagonist antibodies may be appropriate. Various formulations and devices for achieving sustained release are known in the art.

In one embodiment, dosages for an antagonist antibody, peptide, or aptamer may be determined empirically in individuals who have been given one or more
15 administration(s) of an antagonist antibody, peptide, or aptamer. Individuals are given incremental dosages of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer. To assess efficacy, an indicator of the disease can be followed.

Administration of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer in accordance with the method in the present invention can be continuous or intermittent,
20 depending, for example, upon the recipient's physiological condition, whether the purpose of the administration is therapeutic or prophylactic, and other factors known to skilled practitioners. The administration of a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer may be essentially continuous over a preselected period of time or may be in a series of spaced doses.

In some embodiments, more than one antagonist antibody, peptide, or aptamer may be present. At least one, at least two, at least three, at least four, at least five
25 different, or more antagonist antibodies and/or peptides can be present. Generally, those PCSK9 antagonist antibodies or peptides may have complementary activities that do not adversely affect each other. A PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer
30 can also be used in conjunction with other PCSK9 antagonists or PCSK9 receptor antagonists. For example, one or more of the following PCSK9 antagonists may be used: an antisense molecule directed to a PCSK9 (including an anti-sense molecule directed to a nucleic acid encoding PCSK9), a PCSK9 inhibitory compound, and a

PCSK9 structural analog. A PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer can also be used in conjunction with other agents that serve to enhance and/or complement the effectiveness of the agents.

Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and may comprise buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or polyethylene glycol (PEG).

Liposomes containing the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030; and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556. Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in

macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing (2000).

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or 'poly(vinylalcohol)'), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and 7 ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for in vivo administration must be sterile. This is readily accomplished by, for example, filtration through sterile filtration membranes. Therapeutic PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer compositions are generally placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Suitable emulsions may be prepared using commercially available fat emulsions, such as Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ and Lipiphysan™. The active ingredient may be either dissolved in a pre-mixed emulsion composition or alternatively it may be dissolved in an oil (e.g., soybean oil, safflower oil, cottonseed oil, sesame oil, corn oil or almond oil) and an emulsion formed upon mixing with a phospholipid (e.g., egg phospholipids, soybean phospholipids or soybean lecithin) and water. It will be appreciated that other ingredients may be added, for example glycerol or glucose, to adjust the tonicity of the emulsion. Suitable emulsions will typically contain up to 20% oil, for example, between 5 and 20%. The fat emulsion can comprise fat droplets between 0.1 and 1.0 µm, particularly 0.1 and 0.5 µm, and have a pH in the range of 5.5 to 8.0.

The emulsion compositions can be those prepared by mixing a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer with Intralipid™ or the components thereof (soybean oil, egg phospholipids, glycerol and water).

28
30

Compositions for inhalation or insufflation include solutions and suspensions in pharmaceutically acceptable, aqueous or organic solvents, or mixtures thereof, and powders. The liquid or solid compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable excipients as set out above. In some embodiments, the compositions are administered by the oral or nasal respiratory route for local or systemic effect. Compositions in preferably sterile pharmaceutically acceptable solvents may be nebulised by use of gases. Nebulised solutions may be breathed directly from the nebulising device or the nebulising device may be attached to a face mask, tent or intermittent positive pressure breathing machine. Solution, suspension or powder compositions may be administered, preferably orally or nasally, from devices which deliver the formulation in an appropriate manner.

B. PCSK9 antagonists

The methods of the invention use a PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer, which refers to any peptide or nucleic acid molecule that blocks, suppresses or reduces (including significantly reduces) PCSK9 biological activity, including downstream pathways mediated by PCSK9 signaling, such as elicitation of a cellular response to PCSK9.

A PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer should exhibit any one or more of the following characteristics: (a) bind to PCSK9; (b) block PCSK9 interaction with the LDLR; (c) block or decrease PCSK9-mediated down-regulation of the LDLR; (d) inhibit the PCSK9-mediated decrease in LDL blood clearance, (e) increase LDL clearance in media by cultured hepatocytes, (f) increase blood LDL clearance by the liver in vivo, (g) sensitize to statins, and (h) block PCSK9 interaction with other yet to be identified factors.

For purposes of this invention, the antibody, peptide, or aptamer preferably reacts with PCSK9 in a manner that inhibits PCSK9 signaling function and LDLR interaction. In some embodiments, the PCSK9 antagonist antibody specifically recognizes primate PCSK9. In some embodiments, the PCSK9 antagonist antibody binds primate and rodent PCSK9.

The antibodies useful in the present invention can encompass monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antibody fragments (e.g., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), chimeric antibodies, bispecific antibodies, heteroconjugate antibodies, single chain

(ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion (e.g., a domain antibody), human antibodies, humanized antibodies, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity, including glycosylation variants of antibodies, amino acid
5 sequence variants of antibodies, and covalently modified antibodies. The antibodies may be murine, rat, human, or any other origin (including chimeric or humanized antibodies).

In some embodiments, the PCSK9 antagonist antibody is a monoclonal antibody. The PCSK9 antagonist antibody can also be humanized. In other embodiments, the
10 antibody is human.

In some embodiments, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that is immunologically inert, that is, having a reduced potential for provoking an immune response. In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; PCT Publ. No. WO99/58572;
15 and/or UK Patent Application No. 9809951.8. The Fc can be human IgG₂ or human IgG₄. The Fc can be human IgG₂ containing the mutation A330P331 to S330S331 (IgG_{2Δa}), in which the amino acid residues are numbered with reference to the wild type IgG₂ sequence. Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. In some embodiments, the antibody comprises a constant region of IgG₄ comprising the following mutations
20 (Armour et al., 2003, Molecular Immunology 40 585-593): E233F234L235 to P233V234A235 (IgG_{4Δc}), in which the numbering is with reference to wild type IgG₄. In yet another embodiment, the Fc is human IgG₄ E233F234L235 to P233V234A235 with deletion G236 (IgG_{4Δb}). In another embodiment the Fc is any human IgG₄ Fc (IgG₄, IgG_{4Δb} or IgG_{4Δc}) containing hinge stabilizing mutation S228 to P228 (Aalberse et al.,
25 2002, Immunology 105, 9-19). In another embodiment, the Fc can be aglycosylated Fc.

In some embodiments, the constant region is aglycosylated by mutating the oligosaccharide attachment residue (such as Asn297) and/or flanking residues that are part of the glycosylation recognition sequence in the constant region. In some
30 embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically or by expression in a glycosylation deficient host cell.

The binding affinity (K_D) of a PCSK9 antagonist antibody to PCSK9 (such as human PCSK9)) can be about 0.002 to about 200 nM. In some embodiments, the

binding affinity is any of about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 10 nM, about 1 nM, about 500 pM, about 100 pM, about 60 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 15 pM, about 10 pM, about 5 pM, or about 2 pM. In some embodiments, the binding affinity is less than any of about 250 nM, about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 10 nM, about 1 nM, about 500 pM, about 100 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 10 pM, about 5 pM, or about 2 pM.

One way of determining binding affinity of antibodies to PCSK9 is by measuring binding affinity of monofunctional Fab fragments of the antibody. To obtain monofunctional Fab fragments, an antibody (for example, IgG) can be cleaved with papain or expressed recombinantly. The affinity of a PCSK9 Fab fragment of an antibody can be determined by surface plasmon resonance (Biacore3000™ surface plasmon resonance (SPR) system, Biacore, INC, Piscataway NJ) equipped with pre-immobilized streptavidin sensor chips (SA) using HBS-EP running buffer (0.01M HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20). Biotinylated human PCSK9 (or any other PCSK9) can be diluted into HBS-EP buffer to a concentration of less than 0.5 µg/mL and injected across the individual chip channels using variable contact times, to achieve two ranges of antigen density, either 50-200 response units (RU) for detailed kinetic studies or 800-1,000 RU for screening assays. Regeneration studies have shown that 25 mM NaOH in 25% v/v ethanol effectively removes the bound Fab while keeping the activity of PCSK9 on the chip for over 200 injections. Typically, serial dilutions (spanning concentrations of 0.1-10x estimated K_D) of purified Fab samples are injected for 1 min at 100 µL/minute and dissociation times of up to 2 hours are allowed. The concentrations of the Fab proteins are determined by ELISA and/or SDS-PAGE electrophoresis using a Fab of known concentration (as determined by amino acid analysis) as a standard. Kinetic association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are obtained simultaneously by fitting the data globally to a 1:1 Langmuir binding model (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. Methods Enzymology 6. 99-110) using the BIAevaluation program. Equilibrium dissociation constant (K_D) values are calculated as k_{off}/k_{on} . This protocol is suitable for use in determining binding affinity of an antibody to any PCSK9, including human PCSK9, PCSK9 of another mammalian (such as mouse PCSK9, rat PCSK9, primate PCSK9), as well as different forms of PCSK9 (such as α and β form). Binding affinity of an antibody is generally measured at 25°C, but can also be measured at 37°C.

The PCSK9 antagonist antibodies may be made by any method known in the art including the method as provided in Example 1. The route and schedule of immunization of the host animal are generally in keeping with established and conventional techniques for antibody stimulation and production, as further described herein.

5 General techniques for production of human and mouse antibodies are known in the art and/or are described herein. A currently preferred method of making the antibodies comprises the immunization of PCSK9^{-/-} knockout (PCSK9^{-/-}) animals as disclosed herein.

10 It is contemplated that any mammalian subject including humans or antibody producing cells therefrom can be manipulated to serve as the basis for production of mammalian, including human, hybridoma cell lines. Typically, the host animal is inoculated intraperitoneally, intramuscularly, orally, subcutaneously, intraplantar, and/or intradermally with an amount of immunogen, including as described herein.

Hybridomas can be prepared from the lymphocytes and immortalized myeloma
15 cells using the general somatic cell hybridization technique of Kohler, B. and Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497 or as modified by Buck, D. W., et al., 1982, In Vitro, 18:377-381. Available myeloma lines, including but not limited to X63-Ag8.653 and those from the Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, may be used in the hybridization. Generally, the technique involves fusing myeloma cells and
20 lymphoid cells using a fusogen such as polyethylene glycol, or by electrical means well known to those skilled in the art. After the fusion, the cells are separated from the fusion medium and grown in a selective growth medium, such as hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium, to eliminate unhybridized parent cells. Any of the media described herein, supplemented with or without serum, can be used for culturing
25 hybridomas that secrete monoclonal antibodies. As another alternative to the cell fusion technique, EBV immortalized B cells may be used to produce the PCSK9 monoclonal antibodies of the subject invention. The hybridomas are expanded and subcloned, if desired, and supernatants are assayed for anti-immunogen activity by conventional immunoassay procedures (e.g., radioimmunoassay, enzyme immunoassay, or
30 fluorescence immunoassay).

Hybridomas that may be used as a source of antibodies encompass all derivatives, progeny cells of the parent hybridomas that produce monoclonal antibodies specific for PCSK9, or a portion thereof.

Hybridomas that produce such antibodies may be grown in vitro or in vivo using known procedures. The monoclonal antibodies may be isolated from the culture media or body fluids, by conventional immunoglobulin purification procedures such as ammonium sulfate precipitation, gel electrophoresis, dialysis, chromatography, and ultrafiltration, if desired. Undesired activity, if present, can be removed, for example, by running the preparation over adsorbents made of the immunogen attached to a solid phase and eluting or releasing the desired antibodies off the immunogen. Immunization of a host animal with a human PCSK9, or a fragment containing the target amino acid sequence conjugated to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl_2 , or $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, where R and R^1 are different alkyl groups, can yield a population of antibodies (e.g., monoclonal antibodies).

If desired, the PCSK9 antagonist antibody (monoclonal or polyclonal) of interest may be sequenced and the polynucleotide sequence may then be cloned into a vector for expression or propagation. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. Production of recombinant monoclonal antibodies in cell culture can be carried out through cloning of antibody genes from B cells by means known in the art. See, e.g., Tiller et al., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; US Patent No. 7,314,622.

In an alternative, the polynucleotide sequence may be used for genetic manipulation to "humanize" the antibody or to improve the affinity, or other characteristics of the antibody. For example, the constant region may be engineered to more nearly resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. It may be desirable to genetically manipulate the antibody sequence to obtain greater affinity to PCSK9 and greater efficacy in inhibiting PCSK9. It will be apparent to one of skill in the art that one or more polynucleotide changes can be made to the PCSK9 antagonist antibody and still maintain its binding ability to PCSK9.

There are four general steps to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody

light and heavy variable domains; (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process; (3) the actual humanizing methodologies/techniques; and (4) the transfection and expression of the humanized antibody. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent or modified rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant domains. See, for example, Winter et al., 1991, *Nature* 349:293-299; Lobuglio et al., 1989, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224; Shaw et al., 1987, *J Immunol.* 138:4534-4538; and Brown et al., 1987, *Cancer Res.* 47:3577-3583. Other references describe rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant domain. See, for example, Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239:1534-1536; and Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525. Another reference describes rodent CDRs supported by recombinantly engineered rodent framework regions. See, for example, European Patent Publ. No. 0519596. These "humanized" molecules are designed to minimize unwanted immunological response toward rodent anti-human antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients. For example, the antibody constant region can be engineered such that it is immunologically inert (e.g., does not trigger complement lysis). See, e.g., PCT Publ. No. WO99/58572; UK Patent Application No. 9809951.8. Other methods of humanizing antibodies that may also be utilized are disclosed by Daugherty et al., 1991, *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 and in U.S. Patent Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; and 6,350,861; and in PCT Publ. No. WO 01/27160.

In yet another alternative, fully human antibodies may be obtained by using commercially available mice that have been engineered to express specific human immunoglobulin proteins. Transgenic animals that are designed to produce a more desirable or more robust immune response may also be used for generation of humanized or human antibodies. Examples of such technology are Xenomouse™ from Abgenix, Inc. (Fremont, CA), HuMAb-Mouse® and TC Mouse™ from Medarex, Inc.

(Princeton, NJ), and the VelocImmune® mouse from Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Tarrytown, NY).

In an alternative, antibodies may be made recombinantly and expressed using any method known in the art. In another alternative, antibodies may be made recombinantly by phage display technology. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; and 6,265,150; and Winter et al., 1994, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455. Alternatively, the phage display technology (McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-553) can be used to produce human antibodies and antibody fragments in vitro, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed in a variety of formats; see, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., 1993, *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571. Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624-628 isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Mark et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, or Griffith et al., 1993, *EMBO J.* 12:725-734. In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling." (Marks et al., 1992, *Bio/Technol.* 10:779-783). In this method, the affinity of "primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique

allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the pM-nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also known as "the mother-of-all libraries") has been described by Waterhouse et al., 1993, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266. Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from
5 rodent antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also referred to as "epitope imprinting", the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of
10 human variable regions capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e., the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT Publ. No. WO 93/06213). Unlike traditional humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no
15 framework or CDR residues of rodent origin.

It is apparent that although the above discussion pertains to humanized antibodies, the general principles discussed are applicable to customizing antibodies for use, for example, in dogs, cats, primate, equines and bovines. It is further apparent that one or more aspects of humanizing an antibody described herein may be combined,
20 e.g., CDR grafting, framework mutation and CDR mutation.

Antibodies may be made recombinantly by first isolating the antibodies and antibody producing cells from host animals, obtaining the gene sequence, and using the gene sequence to express the antibody recombinantly in host cells (e.g., CHO cells). Another method which may be employed is to express the antibody sequence in plants
25 (e.g., tobacco) or transgenic milk. Methods for expressing antibodies recombinantly in plants or milk have been disclosed. See, for example, Peeters, 2001, et al. Vaccine 19:2756; Lonberg, N. and D. Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol 13:65; and Pollock, et al., 1999, J Immunol Methods 231:147. Methods for making derivatives of antibodies, e.g., humanized, single chain, etc. are known in the art.

Immunoassays and flow cytometry sorting techniques such as fluorescence activated cell sorting (FACS) can also be employed to isolate antibodies that are specific for PCSK9.
30

32
31

The antibodies can be bound to many different carriers. Carriers can be active and/or inert. Examples of well-known carriers include polypropylene, polystyrene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, glass, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses and magnetite. The nature of the carrier can be either
5 soluble or insoluble for purposes of the invention. Those skilled in the art will know of other suitable carriers for binding antibodies, or will be able to ascertain such, using routine experimentation. In some embodiments, the carrier comprises a moiety that targets the myocardium.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using
10 conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors (such as expression vectors disclosed in PCT Publ. No. WO 87/04462), which are then transfected into host cells
15 such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. See, e.g., PCT Publ. No. WO 87/04462. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the
20 homologous murine sequences, Morrison et al., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In that manner, "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of a PCSK9 monoclonal antibody herein.

25 PCSK9 antagonist antibodies and polypeptides derived from antibodies can be identified or characterized using methods known in the art, whereby reduction, amelioration, or neutralization of PCSK9 biological activity is detected and/or measured. In some embodiments, a PCSK9 antagonist antibody or polypeptide is identified by incubating a candidate agent with PCSK9 and monitoring binding and/or attendant
30 reduction or neutralization of a biological activity of PCSK9. The binding assay may be performed with purified PCSK9 polypeptide(s), or with cells naturally expressing, or transfected to express, PCSK9 polypeptide(s). In one embodiment, the binding assay is a competitive binding assay, where the ability of a candidate antibody to compete with a

known PCSK9 antagonist for PCSK9 binding is evaluated. The assay may be performed in various formats, including the ELISA format. In other embodiments, a PCSK9 antagonist antibody is identified by incubating a candidate agent with PCSK9 and monitoring binding and attendant inhibition of LDLR expression and/or blood cholesterol clearance.

Following initial identification, the activity of a candidate PCSK9 antagonist antibody can be further confirmed and refined by bioassays that are known to test the targeted biological activities. Alternatively, bioassays can be used to screen candidates directly. Some of the methods for identifying and characterizing PCSK9 antagonist antibodies, peptides, or aptamers are described in detail in the Examples.

PCSK9 antagonist antibodies may be characterized using methods well known in the art. For example, one method is to identify the epitope to which it binds, or "epitope mapping." There are many methods known in the art for mapping and characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999). In an additional example, epitope mapping can be used to determine the sequence to which a PCSK9 antagonist antibody binds. Epitope mapping is commercially available from various sources, for example, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). The epitope can be a linear epitope, i.e., contained in a single stretch of amino acids, or a conformational epitope formed by a three-dimensional interaction of amino acids that may not necessarily be contained in a single stretch. Peptides of varying lengths (e.g., at least 4-6 amino acids long) can be isolated or synthesized (e.g., recombinantly) and used for binding assays with a PCSK9 antagonist antibody. In another example, the epitope to which the PCSK9 antagonist antibody binds can be determined in a systematic screening by using overlapping peptides derived from the PCSK9 sequence and determining binding by the PCSK9 antagonist antibody. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding PCSK9 is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of PCSK9 with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein

in vitro, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled PCSK9 fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. In an additional example, mutagenesis of an antigen binding domain, domain swapping experiments and alanine scanning mutagenesis can be performed to identify residues required, sufficient, and/or necessary for epitope binding. For example, domain swapping experiments can be performed using a mutant PCSK9 in which various fragments of the PCSK9 polypeptide have been replaced (swapped) with sequences from PCSK9 from another species, or a closely related, but antigenically distinct protein (such as another member of the proprotein convertase family). By assessing binding of the antibody to the mutant PCSK9, the importance of the particular PCSK9 fragment to antibody binding can be assessed.

Yet another method which can be used to characterize a PCSK9 antagonist antibody is to use competition assays with other antibodies known to bind to the same antigen, i.e., various fragments on PCSK9, to determine if the PCSK9 antagonist antibody binds to the same epitope as other antibodies. Competition assays are well known to those of skill in the art.

The crystal structure of the antibody and antibody:antigen complex can also be used to characterize the antibody. The residues are identified by calculating the difference in accessible surface area between the L1L3:PCSK9 crystal structure and PCSK9 structure alone. PCSK9 residues that show buried surface area upon complex formation with L1L3 antibody are included as a part of the epitope. The solvent accessible surface of a protein is defined as the locus of the centre of a probe sphere (representing a solvent molecule of 1.4 Å radius) as it rolls over the Van der Waals surface of the protein. The solvent accessible surface area is calculated by generating surface points on an extended sphere about each atom (at a distance from the atom centre equal to the sum of the atom and probe radii), and eliminating those that lie within equivalent spheres associated with neighboring atoms as implemented in program AREAIMOL (Briggs, P.J., 2000, CCP4 Newsletter No. 38, CCLRC, Daresbury).

An expression vector can be used to direct expression of a PCSK9 antagonist antibody. One skilled in the art is familiar with administration of expression vectors to obtain expression of an exogenous protein in vivo. See, e.g., U.S. Patent Nos. 6,436,908; 6,413,942; and 6,376,471. Administration of expression vectors includes
5 local or systemic administration, including injection, oral administration, particle gun or catheterized administration, and topical administration. In another embodiment, the expression vector is administered directly to the sympathetic trunk or ganglion, or into a coronary artery, atrium, ventricle, or pericardium.

Targeted delivery of therapeutic compositions containing an expression vector, or
10 subgenomic polynucleotides can also be used. Receptor-mediated DNA delivery techniques are described in, for example, Findeis et al., 1993, Trends Biotechnol. 11:202; Chiou et al., 1994, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.); Wu et al., 1988, J. Biol. Chem. 263:621; Wu et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:542; Zenke et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3655;
15 Wu et al., 1991, J. Biol. Chem. 266:338. Therapeutic compositions containing a polynucleotide are administered in a range of about 100 ng to about 200 mg of DNA for local administration in a gene therapy protocol. Concentration ranges of about 500 ng to about 50 mg, about 1 µg to about 2 mg, about 5 µg to about 500 µg, and about 20 µg to about 100 µg of DNA can also be used during a gene therapy protocol. The
20 therapeutic polynucleotides and polypeptides can be delivered using gene delivery vehicles. The gene delivery vehicle can be of viral or non-viral origin (see generally, Jolly, 1994, Cancer Gene Therapy 1:51; Kimura, 1994, Human Gene Therapy 5:845; Connelly, 1995, Human Gene Therapy 1:185; and Kaplitt, 1994, Nature Genetics 6:148). Expression of such coding sequences can be induced using endogenous
25 mammalian or heterologous promoters. Expression of the coding sequence can be either constitutive or regulated.

Viral-based vectors for delivery of a desired polynucleotide and expression in a desired cell are well known in the art. Exemplary viral-based vehicles include, but are not limited to, recombinant retroviruses (see, e.g., PCT Publ. Nos. WO 90/07936; WO
30 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. Patent Nos. 5, 219,740 and 4,777,127; GB Patent No. 2,200,651; and EP Patent No. 0 345 242), alphavirus-based vectors (e.g., Sindbis virus vectors, Semliki forest virus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River virus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246)

and Venezuelan equine encephalitis virus (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), and adeno-associated virus (AAV) vectors (see, e.g., PCT Publ. Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 and WO 95/00655). Administration of DNA linked to killed adenovirus as described in Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3:147, can also be employed.

Non-viral delivery vehicles and methods can also be employed, including, but not limited to, polycationic condensed DNA linked or unlinked to killed adenovirus alone (see, e.g., Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3:147); ligand-linked DNA (see, e.g., Wu, J., 1989, Biol. Chem. 264:16985); eukaryotic cell delivery vehicles cells (see, e.g., U.S. Patent No. 5,814,482; PCT Publ. Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; and WO 97/42338) and nucleic charge neutralization or fusion with cell membranes. Naked DNA can also be employed. Exemplary naked DNA introduction methods are described in PCT Publ. No. WO 90/11092 and U.S. Patent No. 5,580,859. Liposomes that can act as gene delivery vehicles are described in U.S. Patent No. 5,422,120; PCT Publ. Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; and EP 0524968. Additional approaches are described in Philip, 1994, Mol. Cell Biol., 14:2411, and in Woffendin, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1581.

This invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising antibodies described herein or made by the methods and having the characteristics described herein. As used herein, compositions comprise one or more antibodies, peptides, or aptamers that antagonize the interaction of PCSK9 with the LDLR, and/or one or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more these antibodies or peptides. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

The PCSK9 antagonist antibodies and peptides of the invention are characterized by any (one or more) of the following characteristics: (a) bind to PCSK9; (b) block PCSK9 interaction with the LDLR; (c) decrease PCSK9-mediated down-regulation of the LDLR; and (d) inhibit PCSK9-mediated inhibition of LDL blood clearance. Preferably, PCSK9 antibodies have two or more of these features. More preferably, the antibodies have three or more of the features. Most preferably, the antibodies have all four characteristics.

Accordingly, the invention provides any of the following, or compositions (including pharmaceutical compositions) comprising any antibody having a partial light chain sequence and a partial heavy chain sequence as found in Table 1. The underlined sequences are CDR sequences according to Kabat and in bold according to Chothia.

Table 1

mAb	Light Chain Variable Region	Heavy Chain Variable Region
4A5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRV SVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQ QKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> G VPDRFTGSGSGTDFTLTISN VLSEDLAEYFC <u>QQFYSPYT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTD <u>YYMNWVKQSHGKSLEWIG</u> DINPNNGG <u>TTYNQKFKGKATLTVDKS</u> YSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR <u>WL</u> LFAY WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 20)
5A10	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVS ITC <u>KASQDVSTAVA</u> WYQQK PGQSPKLLIY <u>SASYRYT</u> GVP DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ AEDLAVYYC <u>QQRYSTPRTF</u> GGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 17)	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS GYTFTS <u>YWMHWVKQRPGQGLEWIG</u> EINPSNGR <u>TNYNEKFKSKATLTVDKS</u> SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR <u>ER</u> PLYAMDY WGQGSVTVSS (SEQ ID NO: 21)
6F6	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SC <u>SASQGISNYLN</u> WYQQKP DGTVKLLIY <u>YTSSLHSG</u> VPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEP EDIATYYC <u>QQYSKLPFT</u> FGS GTKLEIK (SEQ ID NO: 18)	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTD <u>YYMNWVKQSHGKSLEWIG</u> DINPNNGG <u>TSYNQKFKGKATLTVDK</u> SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAG <u>G</u> GIYYRYDRNYFDY WGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 22)
7D4	DIVMTQSHKFMSTSFGDRVS ITC <u>KASQDVSNALA</u> WYQQK PGHSPKLLIF <u>SASYRYT</u> GVP DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ AEDLAVYYC <u>QQHYSTPWTF</u> GGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 19)	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTAS GFTFSD <u>YYMAWVRQVPEKGLEWVA</u> NINYDGSNT <u>SYLDSLKS</u> RFIISRDNAK NILYLQMSSSLKSEDTATYYCARE <u>EKFA</u> AMDY WGQGSVTVSS (SEQ ID NO: 23)

L1L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITC <u>RASQGISSALAWY</u> QQKP GKAPKLLIY <u>SASYRYT</u> GVPS RFSGSGSGTDFTFTISLQP EDIATYYC <u>QQRYS</u> LWRTFG QGKLEIK (SEQ ID NO: 53)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS <u>GYTFTSY</u> MHWVRQAPGQGLEWM <u>GEIS</u> PFGGRTNYNEKFKSRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>RPLYASDL</u> WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:54)
------	--	---

The invention also provides CDR portions of antibodies to PCSK9 (including Chothia and Kabat CDRs). Determination of CDR regions is well within the skill of the art. It is understood that in some embodiments, CDRs can be a combination of the Kabat and Chothia CDR (also termed "combined CDRs" or "extended CDRs"). In some embodiments, the CDRs are the Kabat CDRs. In other embodiments, the CDRs are the Chothia CDRs. In other words, in embodiments with more than one CDR, the CDRs may be any of Kabat, Chothia, combination CDRs, or combinations thereof.

The invention also provides methods of making any of these antibodies or polypeptides. The antibodies of this invention can be made by procedures known in the art. The polypeptides can be produced by proteolytic or other degradation of the antibodies, by recombinant methods (i.e., single or fusion polypeptides) as described above or by chemical synthesis. Polypeptides of the antibodies, especially shorter polypeptides up to about 50 amino acids, are conveniently made by chemical synthesis. Methods of chemical synthesis are known in the art and are commercially available. For example, an antibody could be produced by an automated polypeptide synthesizer employing the solid phase method. See also, U.S. Patent Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 6,331,415.

In another alternative, the antibodies and peptides can be made recombinantly using procedures that are well known in the art. In one embodiment, a polynucleotide comprises a sequence encoding the heavy chain and/or the light chain variable regions of antibody 4A5, 5A10, 6F6, 7D4 or L1L3. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in a vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. Vectors (including expression vectors) and host cells are further described herein.

The invention also encompasses scFv of antibodies of this invention. Single chain variable region fragments are made by linking light and/or heavy chain variable

regions by using a short linking peptide. Bird et al., 1988, Science 242:423-426. An example of a linking peptide is (GGGS)₃ (SEQ ID NO:24), which bridges approximately 3.5 nm between the carboxy terminus of one variable region and the amino terminus of the other variable region. Linkers of other sequences have been
5 designed and used. Bird et al., 1988, supra. Linkers should be short, flexible polypeptides and preferably comprised of less than about 20 amino acid residues. Linkers can in turn be modified for additional functions, such as attachment of drugs or attachment to solid supports. The single chain variants can be produced either recombinantly or synthetically. For synthetic production of scFv, an automated
10 synthesizer can be used. For recombinant production of scFv, a suitable plasmid containing polynucleotide that encodes the scFv can be introduced into a suitable host cell, either eukaryotic, such as yeast, plant, insect or mammalian cells, or prokaryotic, such as E. coli. Polynucleotides encoding the scFv of interest can be made by routine manipulations such as ligation of polynucleotides. The resultant scFv can be isolated
15 using standard protein purification techniques known in the art.

Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which VH and VL domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with
20 complementary domains of another chain and creating two antigen binding sites (see e.g., Holliger, P., et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al., 1994, Structure 2:1121-1123).

For example, bispecific antibodies, monoclonal antibodies that have binding specificities for at least two different antigens, can be prepared using the antibodies
25 disclosed herein. Methods for making bispecific antibodies are known in the art (see, e.g., Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology 121:210). Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies was based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, with the two heavy chains having different specificities (Millstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

30 According to one approach to making bispecific antibodies, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge,

CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1), containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are
5 cotransfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two
10 polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In one approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in
15 the other arm. This asymmetric structure, with an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule, facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations. This approach is described in PCT Publ. No. WO 94/04690.

Heteroconjugate antibodies, comprising two covalently joined antibodies, are also
20 within the scope of the invention. Such antibodies have been used to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (PCT Publ. Nos. WO 91/00360 and WO 92/200373; EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents and techniques are well known in the art, and are
25 described in U.S. Patent No. 4,676,980.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared in vitro using known methods of synthetic protein chemistry, including those involving cross-linking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include
30 iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

Humanized antibody comprising one or more CDRs of antibodies 5A10 or 7D4 or one or more CDRs derived from antibodies 5A10 or 7D4 can be made, for example, using any methods known in the art. For example, four general steps may be used to

humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody light and heavy variable domains; (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process; (3) using the actual humanizing methodologies/techniques; and (4) transfecting and expressing the humanized antibody. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

In the recombinant humanized antibodies, the Fc portion can be modified to avoid interaction with Fcγ receptor and the complement and immune systems. The techniques for preparation of such antibodies are described in WO 99/58572. For example, the constant region may be engineered to more resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,997,867 and 5,866,692.

Humanized antibody comprising the light or heavy chain variable regions or one or more CDRs of an antibody or its variants shown in Table 1, or one or more CDRs derived from the antibody or its variants shown in Table 2 can be made using any methods known in the art.

Humanized antibodies may be made by any method known in the art.

The invention encompasses modifications to the antibodies and polypeptides of the invention variants shown in Table 1, including functionally equivalent antibodies which do not significantly affect their properties and variants which have enhanced or decreased activity and/or affinity. For example, the amino acid sequence may be mutated to obtain an antibody with the desired binding affinity to PCSK9. Modification of polypeptides is routine practice in the art and need not be described in detail herein. Modification of polypeptides is exemplified in the Examples. Examples of modified polypeptides include polypeptides with conservative substitutions of amino acid residues, one or more deletions or additions of amino acids which do not significantly deleteriously change the functional activity, or which mature (enhance) the affinity of the polypeptide for its ligand, or use of chemical analogs.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl

residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the half-life of the antibody in the blood circulation.

- 5 Substitution variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 2 under the heading of "conservative substitutions." If such substitutions result in a
- 10 change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 2, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 2: Amino Acid Substitutions

Original Residue	Conservative Substitutions	Exemplary Substitutions
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) Non-polar: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar without charge: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Acidic (negatively charged): Asp, Glu;
- (4) Basic (positively charged): Lys, Arg;
- (5) Residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- (6) Aromatic: Trp, Tyr, Phe, His.

Non-conservative substitutions are made by exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant cross-linking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability, particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment.

Amino acid modifications can range from changing or modifying one or more amino acids to complete redesign of a region, such as the variable region. Changes in the variable region can alter binding affinity and/or specificity. In some embodiments, no more than one to five conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In other embodiments, no more than one to three conservative amino acid

substitutions are made within a CDR domain. In still other embodiments, the CDR domain is CDR H3 and/or CDR L3.

Modifications also include glycosylated and nonglycosylated polypeptides, as well as polypeptides with other post-translational modifications, such as, for example, glycosylation with different sugars, acetylation, and phosphorylation. Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions (Jefferis and Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd et al., 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180) and the intramolecular interaction between portions of the glycoprotein, which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Jefferis and Lund, supra; Wyss and Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline-regulated expression of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to have improved ADCC activity (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17:176-180).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine, asparagine-X-threonine, and asparagine-X-cysteine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

The glycosylation pattern of antibodies may also be altered without altering the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g., antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell, variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g., Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

In addition to the choice of host cells, factors that affect glycosylation during recombinant production of antibodies include growth mode, media formulation, culture density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide production (U.S. Patent Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5,278,299). Glycosylation, or certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example, using endoglycosidase H (Endo H), N-glycosidase F, endoglycosidase F1, endoglycosidase F2, endoglycosidase F3. In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered to be defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

Other methods of modification include using coupling techniques known in the art, including, but not limited to, enzymatic means, oxidative substitution and chelation. Modifications can be used, for example, for attachment of labels for immunoassay. Modified polypeptides are made using established procedures in the art and can be screened using standard assays known in the art, some of which are described below and in the Examples.

In some embodiments of the invention, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that is immunologically inert or partially inert, e.g., does not trigger complement mediated lysis, does not stimulate ADCC, or does not activate microglia; or have reduced activities (compared to the unmodified antibody) in any one or more of the following: triggering complement mediated lysis, stimulating ADCC, or activating microglia. Different modifications of the constant region may be used to achieve optimal level and/or combination of effector functions. See, for example, Morgan et al., 1995, Immunology 86:319-324; Lund et al., 1996, J. Immunology 157:4963-9 157:4963-4969; Idusogie et al., 2000, J. Immunology 164:4178-4184; Tao et al., 1989, J. Immunology 143: 2595-2601; and Jefferis et al.,

1998, Immunological Reviews 163:59-76. In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; PCT Publ. No. WO99/58572; and/or UK Patent Application No. 9809951.8. In other embodiments, the antibody comprises a human heavy chain IgG2 constant region comprising the following mutations: A330P331 to S330S331 (amino acid numbering with reference to the wild type IgG2 sequence). Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. In still other embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation by mutating the glycosylated amino acid residue or flanking residues that are part of the N-glycosylation recognition sequence in the constant region. For example, N-glycosylation site N297 may be mutated to A, Q, K, or H. See, Tao et al., 1989, J. Immunology 143: 2595-2601; and Jefferis et al., 1998, Immunological Reviews 163:59-76. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically (such as removing carbohydrate by enzyme PNGase), or by expression in a glycosylation deficient host cell.

Other antibody modifications include antibodies that have been modified as described in PCT Publ. No. WO 99/58572. These antibodies comprise, in addition to a binding domain directed at the target molecule, an effector domain having an amino acid sequence substantially homologous to all or part of a constant domain of a human immunoglobulin heavy chain. These antibodies are capable of binding the target molecule without triggering significant complement dependent lysis, or cell-mediated destruction of the target. In some embodiments, the effector domain is capable of specifically binding FcRn and/or FcγRIIb. These are typically based on chimeric domains derived from two or more human immunoglobulin heavy chain C_H2 domains. Antibodies modified in this manner are particularly suitable for use in chronic antibody therapy, to avoid inflammatory and other adverse reactions to conventional antibody therapy.

The invention includes affinity matured embodiments. For example, affinity matured antibodies can be produced by procedures known in the art (Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783; Barbas et al., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813; Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol.,

155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896; and PCT Publ. No. WO2004/058184).

The following methods may be used for adjusting the affinity of an antibody and for characterizing a CDR. One way of characterizing a CDR of an antibody and/or
5 altering (such as improving) the binding affinity of a polypeptide, such as an antibody, termed "library scanning mutagenesis". Generally, library scanning mutagenesis works as follows. One or more amino acid positions in the CDR are replaced with two or more (such as 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20) amino acids using art recognized methods. This generates small libraries of clones (in some
10 embodiments, one for every amino acid position that is analyzed), each with a complexity of two or more members (if two or more amino acids are substituted at every position). Generally, the library also includes a clone comprising the native (unsubstituted) amino acid. A small number of clones, e.g., about 20-80 clones (depending on the complexity of the library), from each library are screened for binding
15 affinity to the target polypeptide (or other binding target), and candidates with increased, the same, decreased, or no binding are identified. Methods for determining binding affinity are well-known in the art. Binding affinity may be determined using Biacore surface plasmon resonance analysis, which detects differences in binding affinity of about 2-fold or greater. Biacore is particularly useful when the starting antibody already
20 binds with a relatively high affinity, for example a K_D of about 10 nM or lower. Screening using Biacore surface plasmon resonance is described in the Examples, herein.

Binding affinity may be determined using Kinexa Biocensor, scintillation proximity assays, ELISA, ORIGEN immunoassay (IGEN), fluorescence quenching, fluorescence transfer, and/or yeast display. Binding affinity may also be screened using a suitable
25 bioassay.

In some embodiments, every amino acid position in a CDR is replaced (in some embodiments, one at a time) with all 20 natural amino acids using art recognized mutagenesis methods (some of which are described herein). This generates small libraries of clones (in some embodiments, one for every amino acid position that is
30 analyzed), each with a complexity of 20 members (if all 20 amino acids are substituted at every position).

In some embodiments, the library to be screened comprises substitutions in two or more positions, which may be in the same CDR or in two or more CDRs. Thus, the

library may comprise substitutions in two or more positions in one CDR. The library may comprise substitution in two or more positions in two or more CDRs. The library may comprise substitution in 3, 4, 5, or more positions, said positions found in two, three, four, five or six CDRs. The substitution may be prepared using low redundancy codons.

5 See, e.g., Table 2 of Balint et al., 1993, Gene 137(1):109-18).

The CDR may be CDRH3 and/or CDRL3. The CDR may be one or more of CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, and/or CDRH3. The CDR may be a Kabat CDR, a Chothia CDR, or an extended CDR.

10 Candidates with improved binding may be sequenced, thereby identifying a CDR substitution mutant which results in improved affinity (also termed an "improved" substitution). Candidates that bind may also be sequenced, thereby identifying a CDR substitution which retains binding.

Multiple rounds of screening may be conducted. For example, candidates (each comprising an amino acid substitution at one or more position of one or more CDR) with improved binding are also useful for the design of a second library containing at least the original and substituted amino acid at each improved CDR position (i.e., amino acid position in the CDR at which a substitution mutant showed improved binding). Preparation, screening, and selection of this library is discussed further below.

20 Library scanning mutagenesis also provides a means for characterizing a CDR, in so far as the frequency of clones with improved binding, the same binding, decreased binding or no binding also provide information relating to the importance of each amino acid position for the stability of the antibody-antigen complex. For example, if a position of the CDR retains binding when changed to all 20 amino acids, that position is identified as a position that is unlikely to be required for antigen binding. Conversely, if a position of CDR retains binding in only a small percentage of substitutions, that position is identified as a position that is important to CDR function. Thus, the library scanning mutagenesis methods generate information regarding positions in the CDRs that can be changed to many different amino acids (including all 20 amino acids), and positions in the CDRs which cannot be changed or which can only be changed to a few amino acids.

Candidates with improved affinity may be combined in a second library, which includes the improved amino acid, the original amino acid, and may further include additional substitutions at that position, depending on the complexity of the library that is

desired, or permitted using the desired screening or selection method. In addition, if desired, and adjacent amino acid position can be randomized to at least two or more amino acids. Randomization of adjacent amino acids may permit additional conformational flexibility in the mutant CDR, which may, in turn, permit or facilitate the introduction of a larger number of improving mutations. The library may also comprise substitution at positions that did not show improved affinity in the first round of screening.

The second library is screened or selected for library members with improved and/or altered binding affinity using any method known in the art, including screening using Biacore surface plasmon resonance analysis, and selection using any method known in the art for selection, including phage display, yeast display, and ribosome display.

The invention also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies or polypeptides of this invention. In one embodiment, a fusion polypeptide is provided that comprises at least 10 contiguous amino acids of a variable light chain region shown in SEQ ID NOs: 53, 16, 17, 18, or 19 and/or at least 10 amino acids of a variable heavy chain region shown in SEQ ID NOs: 54, 20, 21, 22, or 23. In other embodiments, a fusion polypeptide is provided that comprises at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable light chain region and/or at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable heavy chain region. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises a light chain variable region and/or a heavy chain variable region, as shown in any of the sequence pairs selected from among SEQ ID NOs: 53 and 54, 16 and 20, 17 and 21, 18 and 22, and 19 and 23. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises one or more CDR(s). In still other embodiments, the fusion polypeptide comprises CDR H3 (VH CDR3) and/or CDR L3 (VL CDR3). For purposes of this invention, a fusion protein contains one or more antibodies and another amino acid sequence to which it is not attached in the native molecule, for example, a heterologous sequence or a homologous sequence from another region. Exemplary heterologous sequences include, but are not limited to a "tag" such as a FLAG tag or a 6His tag. Tags are well known in the art.

21
13

A fusion polypeptide can be created by methods known in the art, for example, synthetically or recombinantly. Typically, the fusion proteins of this invention are made by preparing an expressing a polynucleotide encoding them using recombinant methods described herein, although they may also be prepared by other means known in the art, including, for example, chemical synthesis.

This invention also provides compositions comprising antibodies or polypeptides conjugated (for example, linked) to an agent that facilitate coupling to a solid support (such as biotin or avidin). For simplicity, reference will be made generally to antibodies with the understanding that these methods apply to any of the PCSK9 binding and/or antagonist embodiments described herein. Conjugation generally refers to linking these components as described herein. The linking (which is generally fixing these components in proximate association at least for administration) can be achieved in any number of ways. For example, a direct reaction between an agent and an antibody is possible when each possesses a substituent capable of reacting with the other. For example, a nucleophilic group, such as an amino or sulfhydryl group, on one may be capable of reacting with a carbonyl-containing group, such as an anhydride or an acid halide, or with an alkyl group containing a good leaving group (e.g., a halide) on the other.

An antibody or polypeptide of this invention may be linked to a labeling agent such as a fluorescent molecule, a radioactive molecule or any others labels known in the art. Labels are known in the art which generally provide (either directly or indirectly) a signal.

The invention also provides compositions (including pharmaceutical compositions) and kits comprising, as this disclosure makes clear, any or all of the antibodies and/or polypeptides described herein.

The invention also provides isolated polynucleotides encoding the antibodies and peptides of the invention, and vectors and host cells comprising the polynucleotide.

Accordingly, the invention provides polynucleotides (or compositions, including pharmaceutical compositions), comprising polynucleotides encoding any of the following: the antibodies 4A5, 5A10, 6F6, 7D4, L1L3, or any fragment or part thereof having the ability to antagonize PCSK9.

In another aspect, the invention provides polynucleotides encoding any of the antibodies (including antibody fragments) and polypeptides described herein, such as

antibodies and polypeptides having impaired effector function. Polynucleotides can be made and expressed by procedures known in the art.

In another aspect, the invention provides compositions (such as pharmaceutical compositions) comprising any of the polynucleotides of the invention. In some
5 embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding the antibody as described herein. In other embodiment, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding any of the antibodies or polypeptides described herein. In still other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO:25
10 and SEQ ID NO:26. Expression vectors, and administration of polynucleotide compositions are further described herein.

In another aspect, the invention provides a method of making any of the polynucleotides described herein.

Polynucleotides complementary to any such sequences are also encompassed
15 by the present invention. Polynucleotides may be single-stranded (coding or antisense) or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules. RNA molecules include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present
20 within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not, be linked to other molecules and/or support materials.

Polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes an antibody or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Polynucleotide variants contain one or more substitutions, additions,
25 deletions and/or insertions such that the immunoreactivity of the encoded polypeptide is not diminished, relative to a native immunoreactive molecule. The effect on the immunoreactivity of the encoded polypeptide may generally be assessed as described herein. Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably, at least about 80% identity, yet more preferably, at least about 90% identity, and most
30 preferably, at least about 95% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native antibody or a portion thereof.

Two polynucleotide or polypeptide sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides or amino acids in the two sequences is the same when aligned

for maximum correspondence as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, or 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure (National Biomedical Research Foundation, Washington DC), Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, (Academic Press, Inc., San Diego, CA); Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy (Freeman Press, San Francisco, CA); Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polynucleotide or polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid bases or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (i.e. the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

Variants may also, or alternatively, be substantially homologous to a native gene, or a portion or complement thereof. Such polynucleotide variants are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a naturally occurring DNA sequence encoding a native antibody (or a complementary sequence).

5 Suitable "moderately stringent conditions" include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-65°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1 % SDS.

As used herein, "highly stringent conditions" or "high stringency conditions" are
10 those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium
15 chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency
20 wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode a
25 polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal homology to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous
30 genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

The polynucleotides of this invention can be obtained using chemical synthesis, recombinant methods, or PCR. Methods of chemical polynucleotide synthesis are well known in the art and need not be described in detail herein. One of skill in the art can use the sequences provided herein and a commercial DNA synthesizer to produce a
5 desired DNA sequence.

For preparing polynucleotides using recombinant methods, a polynucleotide comprising a desired sequence can be inserted into a suitable vector, and the vector in turn can be introduced into a suitable host cell for replication and amplification, as further discussed herein. Polynucleotides may be inserted into host cells by any means
10 known in the art. Cells are transformed by introducing an exogenous polynucleotide by direct uptake, endocytosis, transfection, F-mating or electroporation. Once introduced, the exogenous polynucleotide can be maintained within the cell as a non-integrated vector (such as a plasmid) or integrated into the host cell genome. The polynucleotide so amplified can be isolated from the host cell by methods well known within the art.
15 See, e.g., Sambrook et al., 1989, supra.

Alternatively, PCR allows reproduction of DNA sequences. PCR technology is well known in the art and is described in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 and 4,683,202, as well as PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al., 1994, eds. (Birkauwer Press, Boston, MA).

20 RNA can be obtained by using the isolated DNA in an appropriate vector and inserting it into a suitable host cell. When the cell replicates and the DNA is transcribed into RNA, the RNA can then be isolated using methods well known to those of skill in the art, as set forth in Sambrook et al., 1989, supra, for example.

Suitable cloning vectors may be constructed according to standard techniques, or
25 may be selected from a large number of cloning vectors available in the art. While the cloning vector selected may vary according to the host cell intended to be used, useful cloning vectors will generally have the ability to self-replicate, may possess a single target for a particular restriction endonuclease, and/or may carry genes for a marker that can be used in selecting clones containing the vector. Suitable examples include
30 plasmids and bacterial viruses, e.g., pUC18, pUC19, Bluescript (e.g., pBS SK+) and its derivatives, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, phage DNAs, and shuttle vectors such as pSA3 and pAT28. These and many other cloning vectors are available from commercial vendors such as BioRad, Strategene, and Invitrogen.

Expression vectors generally are replicable polynucleotide constructs that contain a polynucleotide according to the invention. It is implied that an expression vector must be replicable in the host cells either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include but are not limited to plasmids, viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids, and expression vector(s) disclosed in PCT Publ. No. WO 87/04462. Vector components may generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence; an origin of replication; one or more marker genes; suitable transcriptional controlling elements (such as promoters, enhancers and terminator). For expression (i.e., translation), one or more translational controlling elements are also usually required, such as ribosome binding sites, translation initiation sites, and stop codons.

The vectors containing the polynucleotides of interest can be introduced into the host cell by any of a number of appropriate means, including electroporation, transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; and infection (e.g., where the vector is an infectious agent such as vaccinia virus). The choice of introducing vectors or polynucleotides will often depend on features of the host cell.

The invention also provides host cells comprising any of the polynucleotides described herein. Any host cells capable of over-expressing heterologous DNAs can be used for the purpose of isolating the genes encoding the antibody, polypeptide or protein of interest. Non-limiting examples of mammalian host cells include but are not limited to COS, HeLa, NSO, and CHO cells. See also PCT Publ. No. WO 87/04462. Suitable non-mammalian host cells include prokaryotes (such as *E. coli* or *B. subtilis*) and yeast (such as *S. cerevisiae*, *S. pombe*; or *K. lactis*). Preferably, the host cells express the cDNAs at a level of about 5 fold higher, more preferably, 10 fold higher, even more preferably, 20 fold higher than that of the corresponding endogenous antibody or protein of interest, if present, in the host cells. Screening the host cells for a specific binding to PCSK9 or a PCSK9 domain is effected by an immunoassay or FACS. A cell overexpressing the antibody or protein of interest can be identified.

C. Compositions

The compositions used in the methods of the invention comprise an effective amount of a PCSK9 antagonist antibody, a PCSK9 antagonist antibody derived

polypeptide, or other PCSK9 antagonists described herein. Examples of such compositions, as well as how to formulate them, are also described in an earlier section and below. In one embodiment, the composition further comprises a PCSK9 antagonist. In another embodiment, the composition comprises one or more PCSK9 antagonist antibodies. In other embodiments, the PCSK9 antagonist antibody recognizes human PCSK9. In still other embodiments, the PCSK9 antagonist antibody is humanized. In yet other embodiments, the PCSK9 antagonist antibody comprises a constant region that does not trigger an unwanted or undesirable immune response, such as antibody-mediated lysis or ADCC. In other embodiments, the PCSK9 antagonist antibody comprises one or more CDR(s) of the antibody (such as one, two, three, four, five, or, in some embodiments, all six CDRs). In some embodiments, the PCSK9 antagonist antibody is human.

It is understood that the compositions can comprise more than one PCSK9 antagonist antibody (e.g., a mixture of PCSK9 antagonist antibodies that recognize different epitopes of PCSK9). Other exemplary compositions comprise more than one PCSK9 antagonist antibodies that recognize the same epitope(s), or different species of PCSK9 antagonist antibodies that bind to different epitopes of PCSK9.

The composition used in the present invention can further comprise pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed., 2000, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations, and may comprise buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal

complexes (e.g., Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG). Pharmaceutically acceptable excipients are further described herein.

In one embodiment, the antibody is administered in a formulation as a sterile aqueous solution having a pH that ranges from about 5.0 to about 6.5 and comprising from about 1 mg/ml to about 200 mg/ml of antibody, from about 1 millimolar to about 100 millimolar of histidine buffer, from about 0.01 mg/ml to about 10 mg/ml of polysorbate 80, from about 100 millimolar to about 400 millimolar of trehalose, and from about 0.01 millimolar to about 1.0 millimolar of disodium EDTA dihydrate.

The PCSK9 antagonist antibody and compositions thereof can also be used in conjunction with other agents that serve to enhance and/or complement the effectiveness of the agents.

D. Kits

The invention also provides kits for use in the instant methods. Kits of the invention include one or more containers comprising a PCSK9 antagonist antibody (such as a humanized antibody) or peptide described herein and instructions for use in accordance with any of the methods of the invention described herein. Generally, these instructions comprise a description of administration of the PCSK9 antagonist antibody, peptide, or aptamer for the above described therapeutic treatments.

In some embodiments, the antibody is a humanized antibody. In some embodiments, the antibody is human. In other embodiments, the antibody is a monoclonal antibody. The instructions relating to the use of a PCSK9 antagonist antibody generally include information as to dosage, dosing schedule, and route of administration for the intended treatment. The containers may be unit doses, bulk packages (e.g., multi-dose packages) or sub-unit doses. Instructions supplied in the kits of the invention are typically written instructions on a label or package insert (e.g., a paper sheet included in the kit), but machine-readable instructions (e.g., instructions carried on a magnetic or optical storage disk) are also acceptable.

The kits of this invention are in suitable packaging. Suitable packaging includes, but is not limited to, vials, bottles, jars, flexible packaging (e.g., sealed Mylar or plastic bags), and the like. Also contemplated are packages for use in combination with a specific device, such as an inhaler, nasal administration device (e.g., an atomizer) or an

infusion device such as a minipump. A kit may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The container may also have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is a PCSK9 antagonist antibody. The container (e.g., pre-filled syringe or autoinjector) may further comprise a second pharmaceutically active agent.

Kits may optionally provide additional components such as buffers and interpretive information. Normally, the kit comprises a container and a label or package insert(s) on or associated with the container.

Mutations and Modifications

To express the PCSK9 antibodies of the present invention, DNA fragments encoding V_H and V_L regions can first be obtained using any of the methods described above. Various modifications, e.g., mutations, deletions, and/or additions can also be introduced into the DNA sequences using standard methods known to those of skill in the art. For example, mutagenesis can be carried out using standard methods, such as PCR-mediated mutagenesis, in which the mutated nucleotides are incorporated into the PCR primers such that the PCR product contains the desired mutations or site-directed mutagenesis.

One type of substitution, for example, that may be made is to change one or more cysteines in the antibody, which may be chemically reactive, to another residue, such as, without limitation, alanine or serine. For example, there can be a substitution of a non-canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. In some embodiments, the cysteine is canonical.

The antibodies may also be modified, e.g., in the variable domains of the heavy and/or light chains, e.g., to alter a binding property of the antibody. For example, a mutation may be made in one or more of the CDR regions to increase or decrease the K_D of the antibody for PCSK9, to increase or decrease k_{off} , or to alter the binding specificity of the antibody. Techniques in site-directed mutagenesis are well-known in the art. See, e.g., Sambrook et al. and Ausubel et al., supra.

A modification or mutation may also be made in a framework region or constant domain to increase the half-life of a PCSK9 antibody. See, e.g., PCT Publ. No. WO 00/09560. A mutation in a framework region or constant domain can also be made to alter the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent
5 binding to another molecule, or to alter such properties as complement fixation, FcR binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. According to the invention, a single antibody may have mutations in any one or more of the CDRs or framework regions of the variable domain or in the constant domain.

In a process known as "germlining", certain amino acids in the V_H and V_L
10 sequences can be mutated to match those found naturally in germline V_H and V_L sequences. In particular, the amino acid sequences of the framework regions in the V_H and V_L sequences can be mutated to match the germline sequences to reduce the risk of immunogenicity when the antibody is administered. Germline DNA sequences for human V_H and V_L genes are known in the art (see e.g., the "Vbase" human germline
15 sequence database; see also Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836).

Another type of amino acid substitution that may be made is to remove potential
20 proteolytic sites in the antibody. Such sites may occur in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. Substitution of cysteine residues and removal of proteolytic sites may decrease the risk of heterogeneity in the antibody product and thus increase its homogeneity. Another type of amino acid substitution eliminates asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites,
25 by altering one or both of the residues. In another example, the C-terminal lysine of the heavy chain of a PCSK9 antibody of the invention can be cleaved. In various embodiments of the invention, the heavy and light chains of the PCSK9 antibodies may optionally include a signal sequence.

Once DNA fragments encoding the V_H and V_L segments of the present invention
30 are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes, or to a scFv gene. In these manipulations, a V_L - or V_H -encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA

fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

5 The isolated DNA encoding the V_H region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the V_H-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG2 constant region. The IgG constant region sequence can be any of the various alleles or allotypes known to occur among different individuals, such as Gm(1), Gm(2), Gm(3), and Gm(17). These allotypes represent naturally occurring amino acid substitution in the IgG1 constant regions. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region. The CH1 heavy chain constant region may be derived from any of the heavy chain genes.

 The isolated DNA encoding the V_L region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the V_L-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, C_L. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region. The kappa constant region may be any of the various alleles known to occur among different individuals, such as Inv(1), Inv(2), and Inv(3). The lambda constant region may be derived from any of the three lambda genes.

 To create a scFv gene, the V_H- and V_L-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid

sequence (Gly₄-Ser)₃, such that the V_H and V_L sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the V_L and V_H regions joined by the flexible linker (See e.g., Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554. The single chain
5 antibody may be monovalent, if only a single V_H and V_L are used, bivalent, if two V_H and V_L are used, or polyvalent, if more than two V_H and V_L are used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to PCSK9 and to another molecule.

In another embodiment, a fusion antibody or immunoadhesin may be made that comprises all or a portion of a PCSK9 antibody of the invention linked to another
10 polypeptide. In another embodiment, only the variable domains of the PCSK9 antibody are linked to the polypeptide. In another embodiment, the V_H domain of a PCSK9 antibody is linked to a first polypeptide, while the V_L domain of a PCSK9 antibody is linked to a second polypeptide that associates with the first polypeptide in a manner such that the V_H and V_L domains can interact with one another to form an antigen
15 binding site. In another preferred embodiment, the V_H domain is separated from the V_L domain by a linker such that the V_H and V_L domains can interact with one another. The V_H-linker-V_L antibody is then linked to the polypeptide of interest. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent antibody on a
20 single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

In other embodiments, other modified antibodies may be prepared using PCSK9 antibody encoding nucleic acid molecules. For instance, "Kappa bodies" (Ill et al., 1997, Protein Eng. 10:949-57), "Minibodies" (Martin et al., 1994, EMBO J. 13:5303-9), "Diabodies" (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448), or
25 "Janusins" (Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 and Traunecker et al., 1992, Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52) may be prepared using standard molecular biological techniques following the teachings of the specification.

Bispecific antibodies or antigen-binding fragments can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, e.g.,
30 Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. In addition, bispecific antibodies may be formed as "diabodies" or "Janusins." In some embodiments, the bispecific antibody binds to two different epitopes of PCSK9. In some embodiments, the modified antibodies described

above are prepared using one or more of the variable domains or CDR regions from a human PCSK9 antibody provided herein.

Generation of antigen-specific antibodies

More than 500 polyclonal and monoclonal antibodies raised against recombinant full-length human PCSK9, recombinant full length mouse PCSK9, and various synthetic peptides were evaluated for their ability to down regulate total LDLR protein in cultured Huh7 human liver cells. Among these antibodies were a set of antibodies raised to and reactive with a set of 12-20 amino acid residue polypeptides that, based on the structure of PCSK9, were predicted to cover majority of the protein surface. At the highest concentration, the best antibodies exhibited only about 60% blocking activity.

Thus, an alternative and heretofore unexplored approach was employed, namely, the generation of monoclonal antibodies by immunizing PCSK9 null mice with recombinant full-length PCSK9 protein. This manner of antibody preparation yielded antagonist antibodies that show complete blocking of PCSK9 binding to LDLR, complete blocking of PCSK9-mediated lowering of LDLR levels in Huh7 cells, and lowering of LDLc in vivo including in mice to levels comparable to that seen in PCSK9 -/- mice, as shown in Example 7.

Representative antibodies (hybridomas) of the present invention were deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) on February 28, 2008, and were assigned the accession numbers in Table 3. Hybridomas were deposited for antibodies 4A5, 5A10, 6F6 and 7D4.

Table 3

<u>Antibody Reference</u>	<u>ATCC Accession No.</u>
4A5	PTA-8985
5A10	PTA-8986
6F6	PTA-8984
7D4	PTA-8983

Examples

Example 1: Generating and Screening PCSK9 Antagonist Antibodies

General procedures for immunization of animals for generating monoclonal antibodies:

Balb/c or 129/bl6 pcsk9 ^{-/-} mice were injected 5 times on a 13 day schedule with 100 µg antigen. PCSK9 ^{-/-} (that is, null or knock-out mice) can be obtained from, or as described by, Rashid et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102: 5374. See also U.S. Pat. No. 7,300,754. For the first 4 injections, antigen was prepared by mixing the recombinant proteins with adjuvant. Immunogen was given via injection to the scruff of the neck, the foot pads and intraperitoneally, approximately every 3 days over the course of 11 days, with the last boost administered i.v., without adjuvant. On Day 13, the mice were euthanized and their spleens were removed. Lymphocytes were immortalized by fusion with an established cell line to make hybridoma clones using standard hybridoma technology, distributed into 96 well plates. Clones were allowed to grow, then selected by ELISA screening using the immunizing antigen, as below.

ELISA screening of antibodies:

Supernatant media from growing hybridoma clones were screened separately for their ability to bind the recombinant human PCSK9 or recombinant mouse PCSK9. The assays were performed with 96-well plates coated overnight with 100 µl of a 1 µg/ml solution of one of the antigens. Excess reagents were washed from the wells between each step with PBS containing 0.05% Tween-20. Plates were then blocked with PBS containing 0.5% BSA. Supernatant was added to the plates and incubated at room temperature for 2 hours. Horse radish peroxidase (HRP) conjugated goat-anti mouse Fc was added to bind to the mouse antibodies bound to the antigen. Tetramethyl benzidine was then added as substrate for HRP to detect the amount of mouse antibody present in the supernatant. The reaction was stopped and the relative amount of antibody was quantified by reading the absorbance at 450 nm. Hybridoma clones that secreted antibodies that are capable of binding to either mouse or human PCSK9 were selected for further analysis.

PCSK9-mediated LDLR down-regulation in Huh7 cells:

Hybridoma clones secreting human or mouse PCSK9 binding antibodies were expanded and supernatants were harvested. Total IgGs were purified from approximately 10 ml of the supernatant using protein A beads, dialyzed into PBS buffer, and the final volume reduced to yield solutions with 0.7-1 mg/ml of antibodies. Purified

antibodies were then used to test their ability to inhibit the ability of PCSK9 to mediate LDLR down-regulation in Huh7 cells. Huh7 cells were plated and allowed to grow to 80% confluency in RPMI media containing 10% FBS, 4 mM glutamine, and penicillin and streptavidin in 96 well plates. The medium was changed to one containing 10% de-lipidated FBS for 8-16 hrs to induce LDLR expression. Cells were then incubated for 8-16 hours with 40 µl/well of 293 expression media supplemented with 6 µg/ml of human (preferably) or mouse PCSK9, with or without 70-100 µg/ml of test antibodies. The PCSK9 and antibody containing media were removed at the end of incubation, and cells were lysed with 17 µl lysis buffer by shaking at 4 C for an hour. The lysis buffer consisted of 50 mM glycerol phosphate, 10 mM HEPES pH 7.4, 1% Triton X-100, 20 mM NaCl, and a cocktail of protease inhibitors (Roche). Cell lysates were collected and analyzed for LDLR protein levels via staining of Western blots following SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Hybridoma clones producing antibodies that can partially or fully rescue LDLR level were selected for further analysis. By "LDLR down regulation assay" is meant the above assay using Huh7 cells.

Figure 1 illustrates the effect of anti-PCSK9 antagonistic monoclonal antibodies 7D4.4, 4A5.G3, 6F6.G10.3 and 5A10.B8 on the ability of human and mouse PCSK9 to down regulate LDLR in cultured Huh7 cells. 100 nM of mouse or human recombinant PCSK9, and a serial dilution of 25-800 nM of antibodies were used. A) mouse PCSK9. B) human PCSK9. The figures are Western blots showing that the antibodies are in general more effective in blocking the function of human PCSK9 than mouse PCSK9. The several antibodies have generally similar affinities for human PCSK9 but vary in their affinity for murine PCSK9.

Example 2: Determining Antibody Binding Affinity

The affinities of PCSK9 antibodies to PCSK9 were measured on a surface plasmon resonance Biacore 3000 biosensor equipped with a research-grade sensor chip using HBS-EP running buffer (Biacore AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare). Rabbit polyclonal anti-Ms IgGs were amine-coupled at saturating levels onto the chip using a standard N-hydroxysuccinimide/ ethyldimethylaminopropyl carbodiimide (NHS/EDC) chemistry. The buffer was switched to HBS-EP + 1 mg/mL BSA + 1 mg/mL CM-dextran. Full-length PCSK9 IgGs were diluted to about 15 µg/mL and captured for 1 min at 5 µL/min to give levels of about 500RU per flow cell, leaving

one blank to serve as a reference channel. 3.73-302 nM hPCSK9 or 2.54-206 nM mPCSK9 were injected as a 5-membered 3-fold series for 1 min at 100 µL/min. Dissociation was monitored for 5 min. The chip was regenerated after the last injection of each titration with two 30 sec pulses of 100 mM phosphoric acid. Buffer cycles provided blanks for double-referencing the data, which were then fit globally to a simple binding model using Biaevaluation software v.4.1. Affinities were deduced from the quotient of the kinetic rate constants ($K_D = k_{off}/k_{on}$). The results of Example 2 are shown in Table 4. These data show that the antibodies have excellent affinity for murine PCSK9 or human PCSK9, as indicated.

10

Table 4					
mAb	ligand	Inhibition of LDLR- PCSK9 binding (IC ₅₀)	K _{on} for PCSK9 (1/Ms)	K _{off} for PCSK9 (1/S)	K _D for PCSK9 (nM)
4A5	human	0.4 nM	6.66 x 10 ⁴	1.89 x 10 ⁻⁴	2.8
5A10	human	0.4 nM	8.47 x 10 ⁴	8.55 x 10 ⁻⁵	1
6F6	human	1.5 nM	9.15 x 10 ⁴	5.84 x 10 ⁻⁴	6.4
7D4	human	1.5 nM	1.25 x 10 ⁵	7.94 x 10 ⁻⁴	6.4
4A5	mouse	3 nM	1.41 x 10 ⁵	7.2 x 10 ⁻⁴	5.1
5A10	mouse	3 nM	1.27 x 10 ⁵	4.89 x 10 ⁻⁴	3.9
6F6	mouse	10 nM	1.11 x 10 ⁵	1.97 x 10 ⁻³	17.7
7D4	mouse	1 nM	3.92 x 10 ⁴	5.23 x 10 ⁻⁴	1.3

Example 3: Analysis of the Effect of PCSK9 Antibodies on PCSK9-LDLR Interaction

PCSK9 has been shown to bind LDLR with an affinity of 180 nM under neutral pH (Cunningham et al., 2007, Nat Struct Mol Biol, 14(5):413-9). Recombinant mouse or human PCSK9 protein was biotinylated using the Pierce reagents following the manufacture's instructions. ELISA plates (Corning Mixisorb) were coated with a solution of 1 µg/ml recombinant LDLR extracellular domain (R&D Systems) in each well at 4 C overnight, blocked with 2% BSA + PBS for 2 hrs at room temperature, and then washed 5 times with washing buffer (1x PBS + 0.05% Tween-20). Wells were incubated with 50 µl of indicated concentrations of biotinylated PCSK9 protein for 1 hr RT. LDLR-PCSK9 binding can be stabilized by adding 50 µl of 4% FDH + 4% sucrose + PBS solution and

15

20

incubate for 5 min. Wells were washed 5 times with washing buffer, incubated with 1:2000 dilution of HRP conjugated Streptavidin (Invitrogen) for 1 hr at RT, washed 5 times with washing buffer. TMB substrate was added to the wells, the solution was incubated 20 to 30 min at RT, and the reaction was terminated using 1 M phosphoric acid. Signals were read at 450 nm.

Figure 2 illustrates the dose-response of anti-PCSK9 antagonist monoclonal antibodies 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3, 5A10.B8, negative control antibody 42H7, and PBS on blocking the binding of recombinant biotinylated human PCSK9 and mouse PCSK9 to immobilized recombinant LDLR extracellular domain in vitro. Part A) shows human PCSK9 binding to human LDLR extracellular domain and that 7D4, 4A5, 5A10, and 6F6 are effective in blocking binding, whereas 42H7 and PBS are not. Part B) shows mouse PCSK9 binding to human LDLR extracellular domain.

The interaction can also be evaluated in free solution at neutral pH. Figure 3 illustrates the dose-response of anti-PCSK9 monoclonal antagonist antibodies 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3 and 5A10.B8 on blocking binding of recombinant biotinylated human PCSK9 (30 nM) to Europium labeled recombinant LDLR extracellular domain (10 nM) in solution at neutral pH in vitro. This assay measures binding in free solution at neutral pH.

Example 4: Epitope Mapping/Binding of Antibodies using the Crystal Structure of the L1L3:PCSK9 Complex, Biacore, and Mutagenesis

a. Crystal structure of the L1L3:PCSK9 complex. The residues were identified by calculating the difference in accessible surface area between the L1L3:PCSK9 crystal structure and PCSK9 structure alone. PCSK9 residues that show buried surface area upon complex formation with L1L3 antibody were included as a part of the epitope. The solvent accessible surface of a protein was defined as the locus of the centre of a probe sphere (representing a solvent molecule of 1.4 Å radius) as it rolls over the Van der Waals surface of the protein. The solvent accessible surface area was calculated by generating surface points on an extended sphere about each atom (at a distance from the atom centre equal to the sum of the atom and probe radii), and eliminating those that lie within equivalent spheres associated with neighboring atoms as implemented in program AREAIMOL (Briggs, P.J., 2000, CCP4 Newsletter No. 38, CCLRC, Daresbury).

The result of the crystal structure analysis are shown in Figure 23. Figure 23A shows the crystal structure of the PCSK9 (light gray surface representation) bound to the L1L3 antibody (black cartoon representation). The epitope for L1L3 binding to PCSK9 involves residues 153-155, 194, 197, 237-239, 367, 369, 374-379 and 381 of the PCSK9 amino acid sequence (SEQ ID NO:53). By comparison, the epitope for the LDLR EGF domain binding to PCSK9 involves residues 153-155, 194, 238, 367, 369, 372, 374-375, and 377-381 (Kwon et al., 2008, PNAS 105: 1820-1825).

b. Group antibodies and epitopes based on competition in PCSK9 binding. Full-length IgGs were amine-coupled to a CM5 sensor chip (three per chip at about 7000RU final), using a standard EDC/NHS-mediated amine-coupling chemistry. One flow cell was left unmodified to provide a reference channel. Human-PCSK9 (100 nM) was premixed with an array of IgGs (final 500 nM) and these complexes were injected over the chip using 1 min injections at 10 μ L/min. Antibodies that bind to competing epitopes will block the binding of PCSK9 to the antibody immobilized on the chip. Alternatively, a classical sandwich approach was used by first injecting human-PCSK9 at 50 nM for 1 min at 10 μ L/min (to tether it via the IgG on the chip) and then binding an array of IgGs (final 500 nM each) for 2 mins each. The immobilized IgGs were regenerated with a mild acid (Pierce gentle elution buffer + 1 M NaCl). Antibodies directed to known different epitopes were used as controls for positive sandwich formation in this assay.

c. Structure-guided mutagenesis to map antibody binding epitopes. Based on the crystal structure of PCSK9 and the likely involvement of D374 in LDLR binding (Cunningham et al., 2007, Nat Struct Mol Biol, 14(5): 413-419), nineteen PCSK9 surface-residue mutants (F379A, I369A, R194A, D374Y, D238R, T377R, K222A, R199A, F216A, R218A, R237A, D192R, D367R, R165A, R167A, A443T, A53V, I474V, H449A) near or far from the position of D374 were chosen for mutation to map the antibody binding epitopes.

d. Mutant and antibody production. The 19 single point mutants were generated from the previously described wild-type DNA construct (Cunningham et al., 2007, *supra*) using standard DNA techniques. The mutant proteins were expressed using transient transfection in HEK293T cells and secreted into the cell media. The mutant proteins were purified with the high-throughput AKTA Xpress system (GE Healthcare) by Ni²⁺ and size-exclusion chromatography steps, using conditions similar to those described earlier. Protein concentrations were determined using the LabChip instrument (Bio-

Rad). The PCSK9-blocking murine antibodies 4A5, 7D4, 5A10 and 6F6 were expressed with transient transfection in HEK293F cells and purified with a protein G column eluted with 0.1 M Glycine buffer at pH 2.8 and neutralized into 1.0 M Tris at pH 9.0.

e. The regions of PCSK9 that are contacted by monoclonal antibodies 5A10 and 7D4 (preparation described later herein) were determined by protein tomography (Sidel AB, Stockholm, Sweden). The loops at positions 186-200, 371-379, 176-181, 278-283, 449-453, 402-406, and 236-245 of PCSK9 were proximal to amino acid residues of the antibody. The sequences corresponding to the loops are shown in Table 5, and in a preferred embodiment, the antagonists of the invention bind to one or more of these sequences in PSCK9.

TABLE 5

PCSK9 Loops	Sequence	SEQ ID NO.
186-200	DTSIQSDHREIEGRV	1
236-245	GRDAGVAKGA	2
371-379	ASSDCSTCF	3
176-181	GGSLVE	4
278-283	QPVGPL	5
449-453	HGAGW	6
402-406	AEPEL	7

f. Biacore binding of the mutants to immobilized LDLR. Recombinant LDLR extracellular domain protein was immobilized onto a Biacore SA chip. Each mutant protein was injected to the Biacore-3000 M) in duplicates at 25 mM to 0.012 mM at five concentrations (from 1 °C, with a running buffer of 50 mM Tris pH 7.5, 2 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 0.02% P20 and 1 mg/ml BSA. All the results fit nicely to a 1:1 binding kinetics model. As expected, mutation at residues in direct contact with the EGF-A domain (F379A, R194A, I369A, T377R, D238R) significantly weakens (by 10-100 fold) LDLR binding. Moreover, three mutants not in contact with EGF-A (R199A, R218A, K222A) showed weaker binding (5-15 fold). This new finding suggests that they are involved in binding other domains of LDLR. Overall, these experiments validate the integrity and activity of the mutants for subsequent epitope mapping experiments.

g. Binding of the mutants to immobilized 4A5, 7D4, 5A10 and 6F6 antibodies. Biotinylated anti-PCSK9 antibodies were immobilized on SA chips using standard methods. Mutant binding experiments were performed using Biacore 3000 at 25 °C with a running buffer of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.02% P20. Mutants were

tested at 333 nM or 111 nM concentrations in duplicates, with the ones giving weakened binding compared to the wild-type as the residues involved in mAb binding (listed below).

mAb	Binding Residues in Descending Order of Mutant Effects
4A5	R237, F379, 369, R194, R199 & D238
5A10	R194, R237, I369, D238, R199
6F6	R237, R194, F379, D238, I369, T377, R199
7D4	R237, R194, F379, I369, R199

5

Example 5: Cloning and Sequencing of Antibodies

One million hybridoma cells were homogenized using the QIAshredder spin columns and total RNA was extracted according to RNeasy Micro kit from QIAGEN. cDNA was synthesized using SuperScript III RT kit from Invitrogen. Variable regions from the PCSK9 antibodies were cloned using the mouse IgG-Primer Sets from Novagen, which consist of degenerate primers for cloning mouse IgG heavy chain genes and the mouse kappa or lambda light chains. PCR cycling conditions were the followings: 1 cycle at 92 C for 2 min; two cycles at 94 C for 30 sec, 44 C for 30 sec and 72 C for 2 min; two cycles at 94 C for 30 sec, 46 C for 30 sec and 72 C for 2 min; two cycles at 94 C for 30 sec, 48 C for 30 sec and 72 C for 2 min; two cycles at 94 C for 30 sec, 50 C for 30 sec and 72 C for 2 min; two cycles at 94 C for 30 sec, 52 C for 30 sec and 72 C for 2 min; followed by 35 cycles at 94 C for 30 sec, 54 C for 30 sec and 72 C for 45 sec. The resulting PCR products were cloned into Topo-TA cloning vector from Invitrogen and sequenced. The cloned antibody sequences were confirmed by N-terminal sequencing of the first 10 amino acids of the original antibodies produced from ascites.

10

15

20

Example 6: Generation of Antigens for Immunization

Recombinant human PCSK9 protein was produced as reported Cunningham et al., 2007, Nat Struct Mol Biol, 14(5):413-9. To produce recombinant mouse PCSK9 protein, the cDNA of mouse PCSK9 was cloned into mammalian expression vector PRK5 with the addition of a 6-His tag at the C-terminus by methods known in the art, transiently transfected and expressed in HEK293 cells. Recombinant protein was purified from conditioned media using a Ni column.

Surface peptides of human and mouse PCSK9 were selected based on PCSK9 protein structure, and synthesized by Elim Biopharmaceuticals.

Example 7: PCSK9-Specific Antibodies as PCSK9 Antagonists

1. Identification of PCSK9-specific antagonist antibodies

a. Identification of PCSK9-blocking antibodies

Murine antibodies to human and/or mouse PCSK9 were generated by immunizing mice with human-PCSK9 and mouse-PCSK9 synthetic peptides as prepared in Example 6 or recombinant proteins, and screening antibodies by ELISA assay using human and/or mouse PCSK9 recombinant protein as the antigens as described in Example 1 and other standard hybridoma procedures. Over 500 positive clones were obtained and allowed to grow to confluency in 6 well plates with 10 ml media. Media supernatant were collected and total IgGs in the conditioned media were purified using mAb Select (Pierce). The ability of purified and concentrated mouse IgGs to inhibit mouse and human PCSK9 function was tested in Huh7 cells using the methods described in Example 1. Hybridoma clones expressing IgGs that showed some degrees of blocking were expanded and retested. 60 promising clones were subcloned, expanded, and injected into either Balb/c or nude mice to produce ascites. Antibodies purified from ascites fluid were retested for their ability to inhibit the down regulation of LDLR by human or mouse PCSK9 in Huh7 cells. Four hybridoma clones, 4A5, 5A10, 6F6, and 7D4, were identified as being able to completely inhibit human PCSK9 function, and at least partially inhibit mouse PCSK9 function. To determine IC₅₀ of each of these blocking antibodies, a serial dilution of IgGs were used in the assay, starting from 100 µg/ml to 3.125 µg/ml, with human and mouse PCSK9 concentration being constant at 6 µg/ml.

b. Effect of PCSK9 antagonists on PCSK9-LDLR binding

PCSK9 has been shown to be co-localized with LDLR in cellular compartments (Lagace et al., 2006, J Clin Inv, 116(11):2995-3005. Recombinant PCSK9 protein also binds to LDLR extracellular domain in vitro (Fisher et al., 2007, JBC, 282(28):20502-12.

5 To determine the relationship between inhibition of PCSK9 mediated down-regulation of LDLR and inhibition of PCSK9-LDLR binding by antibodies, we tested the PCSK9 antibodies that partially or completely blocked PCSK9 function on LDLR and representatives of antibodies that do not block. All partial antagonistic antibodies also partially inhibited LDLR extracellular domain binding to PCSK9, except one.

10 Antagonistic antibodies that can completely block PCSK9 function, namely 4A5, 5A10, 6F6 and 7D4 also completely inhibited LDLR extracellular domain binding to PCSK9 (Table 5). IC₅₀ values of these four antibodies correlates with their binding affinity to PCSK9.

15

c. Epitope determination of the blocking antibodies

Figure 4 illustrates the epitope binning of anti-PCSK9 antibodies. Part A) shows epitope information of anti-PCSK9 mAbs, determined by binding to synthetic 13-18-mer peptides or epitope binding via Biacore. Part B) shows the ability of immobilized

20 antibodies 6F6, 5A10 and 4A5 to bind to human PCSK9 premixed with the mAbs indicated on the y axis by Biacore assay.

Another monoclonal anti-PCSK9 antibody, termed 6G7, binds to recombinant mouse PCSK9 but not human PCSK9. See Table 6. 6G7, 4A5, 5A10, 6F6, and 7D4

25 mutually exclude each other's binding to mouse PCSK9. Chimera analysis between mouse and human PCSK9 reveals that 6G7 binding to PCSK9 requires the catalytic domain. See Table 6. Thus the binding sites of 4A5, 5A10, 6F6, and 7D4 overlap the catalytic site and/or the epitope bound by 6G7.

Table 6

Recombinant protein	6G7 binding
Human PCSK9	No
Human pro + human catalytic + mouse C-term	No

Human pro + mouse catalytic + mouse C-term	Yes
Mouse pro + human catalytic + human C-term	No
Mouse Pro + mouse catalytic + human C-term	Yes
Mouse PCSK9	yes

d. Determining sequences species specificity of anti-PCSK9 antibodies

To determine the species specificity of the anti-PCSK9 antibodies, antibodies were incubated with plasma from different species and the resultant complexes were purified and probed by an independent anti PCSK9 antibody on Western blots. The antibodies 4A5, 5A10, 6F6, and 7D4 recognized human, cynomolgus monkey, mouse, and rat PCSK9. See Figure 5. Antibody 6G7 recognized only murine PCSK9 and an unrelated control antibody 42H7 did not recognize any tested PCSK9. Id.

e. Determining sequences of antagonist PCSK9 antibodies

The amino acid sequences of the variable domains of PCSK9 antibodies 4A5, 5A10, 6F6, and 7D4 were determined using the method described in Example 5. The sequences indicate that the antibodies are related but different from each other. Table 1 shows the amino acid sequences of the variable regions of each antibody. Table 7 shows the CDR sequences of the light chains and heavy chains of Table 1 as identified by the Kabat and Chotia methods.

Table 7. Blocking PCSK9 Antibodies and Antigen-binding CDR Sequences according to Kabat (underlined) and Chotia (bold).

	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
4A5	<u>KASQNVGTNVA</u> (SEQ ID NO:27)	<u>SASYRYS</u> (SEQ ID NO:28)	<u>QQFYSPYT</u> (SEQ ID NO:29)
5A10	<u>KASQDVSTAVA</u> (SEQ ID NO:30)	<u>SASYRYT</u> (SEQ ID NO:12)	<u>QQRYSTPRT</u> (SEQ ID NO:31)
6F6	<u>SASQGISNYLN</u> (SEQ ID NO:32)	<u>YTSSLHS</u> (SEQ ID NO:33)	<u>QQYSKLPFT</u> (SEQ ID NO:55)
7D4	<u>KASQDVSNALA</u> (SEQ ID NO:34)	<u>SASYRYT</u> (SEQ ID NO:12)	<u>QQHYSTPWT</u> (SEQ ID NO:35)

L1L3	<u>RASQGISSALA</u> (SEQ ID NO:11)	<u>SASYRYT</u> (SEQ ID NO:12)	<u>QQRYS LWRT</u> (SEQ ID NO:13)
	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
4A5	<u>GYTFTDY YMN</u> (SEQ ID NOs: 56(whole), 36 and 37)	<u>DINPNNGGTTYNQKFKG</u> (SEQ ID NOs: 38 and 39)	<u>WLLFAY</u> (SEQ ID NO:40)
5A10	<u>GYTFTSYWMH</u> (SEQ ID NOs: 57(whole), 41 and 42)	<u>EINPSNGRTNYNEKFKS</u> (SEQ ID NO: 43 and 44)	<u>ERPLYAMDY</u> (SEQ ID NO:45)
6F6	<u>GYTFTDY YMN</u> (SEQ ID NOs: 56(whole), 36 and 37)	<u>DINPNNGGTSYNQKFKG</u> (SEQ ID NO: 38 and 46)	<u>GGIYYRYDRNYFDY</u> (SEQ ID NO:47)
7D4	<u>GFTFSDY YMA</u> (SEQ ID NOs: 58(whole), 48 and 49)	<u>NINYDGSNTSYLDSLKS</u> (SEQ ID NOs: 50 and 51)	<u>EKFAAMDY</u> (SEQ ID NO:52)
L1L3	<u>GYTFTSY YMH</u> SEQ ID NOs: 59(whole), 60 , and 8 .	<u>EISPFGGRTNYNEKFKS</u> (SEQ ID NO: 9 and 61)	<u>ERPLYASDL</u> (SEQ ID NO:10)

Anti-PCSK9 IgGs 4A5, 5A10 and 6F6 were amine coupled to the Biacore chip. hPCSK9 (100 nM) was mixed with 500 nM of 4A5, 5A10, 6F6 or 7D4 in various ratios and injected for 1 min at 10 µl/min. The four antibodies mutually blocked one another irrespective of the assay orientation tested, suggesting that they all bind to competing epitopes. In contrast, they are able to form sandwich complexes with other non-fully-blocking antibodies that were mapped to specific regions using synthetic peptides.

2. Effect of PCSK9 specific antibodies as PCSK9 antagonist in vivo
a. PCSK9 antagonist antibodies lower serum cholesterol in mice

To determine if PCSK9 antagonist monoclonal antibodies can affect cholesterol levels in vivo by inhibiting the function of extracellular PCSK9, the effect of 7D4 was tested against mouse PCSK9 in vitro, on serum cholesterol when injected into mice. to 7 week old male C57/bl6 mice were kept on a 12 hr light/dark cycle, bled to collect

approximately 70 µl serum on day -7. Antagonist PCSK9 antibody 7D4, and a control isotype matching monoclonal antibody were injected into male 7 week old C57/bl6 mice via i.p. injections on days 0, 1, 2, and 3. Mice were sacrificed on day 4 without fasting, and serum samples were collected. All frozen serum samples were sent to IDEXX laboratories for total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol and LDL cholesterol measurements. Figure 6 shows that 7D4 lowered serum cholesterol by 48%, while the control antibody did not have any significant affect. Both the amount and percentage of reduction are similar to what was reported for PCSK9^{-/-} mice (PCSK9 knock-out mice), suggesting that one can achieve complete or near complete inhibition of PCSK9 function through blocking extracellular PCSK9 only, and that intracellular PCSK9 plays little or no role in down-regulating LDLR under normal physiological conditions. As expected, liver LDLR levels were induced in animals treated with 7D4 compared to those treated with a control antibody (Figure 6).

b. A partially blocking antibody had no effect on blood cholesterol levels

Figure 7 illustrates that a partial antagonist polyclonal anti-PCSK9 mAb CRN6 does not affect cholesterol levels in mice. Two groups of 8 week old C57/bl6 mice (n=10 mice/group) were bled and tested for cholesterol levels on day -7; dosed with 15 mg/kg/day of CRN6 or a control antibody by i.v. administration on days 0, 1, 2 and 3; and then bled and tested for cholesterol levels 24 hrs after the final dose. Figure 7A shows that CRN6 antibody partially blocks PCSK9 mediated down regulation of LDLR in Huh7 cells in vitro. Figure 7B shows that administration of CRN6 antibody does not affect serum cholesterol levels in mice.

c. Prolonged effect on serum cholesterol by antagonist PCSK9 mAb in mice.

A time course study was performed to determine the time of onset and duration of the cholesterol lowering effect of PCSK9 antagonist antibodies in mice. MAb 7D4 or saline control were each injected i.v. at 10 mg/kg or 3 ml/kg in 48 6-week-old C57/bl6 mice. Eight mice from each treatment group were sacrificed on days 1, 2, 4, 7, 14 and 21 after injection. A single injection of 7D4 produced a fast and prolonged lowering effect on serum cholesterol. A 25% reduction in serum cholesterol was seen at 24 hrs after injection. See Figure 8. Maximum drop of serum cholesterol was observed at the 7 day time point. At 21 days, the reduction in cholesterol is no longer statistically significant. Part B) shows HDL cholesterol. LDL cholesterol levels were very low.

Figure 9 illustrates that the anti-PCSK9 antagonist mAb 7D4 dose dependently reduces serum total cholesterol, HDL, and LDL in mice. Six groups of 8 week old C57/bl6 mice (n=8/group) were bled and tested for basal cholesterol levels on day -7 and administered with the indicated doses of antibodies or saline on days 0, 1, 2, and 3 by i. p. bolus injection. Serum samples were collected and tested for cholesterol levels 24 hrs after the last dose. Figure 9A shows total cholesterol levels, which decreased to less than 60% of control after administration of 3 to 30 mg/kg/day. The maximal effect on total cholesterol was seen at 10 mg/kg, and statistically significant reduction at 1 mg/kg. Figure 9B shows HDL levels, which decreased to less than 70% after administration of 3 to 30 mg/kg/day. Figure 9C shows LDL levels, which decreased to nearly zero at all tested doses of 0.3 mg/kg/day and above.

d. Dose response of antagonist antibodies specific to PCSK9 in mice

Figure 10 illustrates that anti-PCSK9 antagonist antibody 5A10 dose dependently lowers cholesterol levels in mice. Figure 10A shows six groups of 8 week old C57/bl6 mice (n=8/group) to which were administered the indicated doses of antibodies or saline daily on days 0, 1, 2, and 3 by i.v. bolus injection. Serum samples were collected and tested for cholesterol levels 24 hrs after the last dose and showed a graduated decrease with increasing dose of antibody. Figure 10B shows five groups of 8 week old C57/bl6 mice (n=8/group) to which were administered the indicated doses of antibodies or saline on day 0 by i. p. bolus injection. Serum samples were collected and tested for cholesterol levels on day 7 and also showed a graduated decrease with increasing doses of antibody.

Figure 11 illustrates that anti-PCSK9 antagonist antibodies 4A5 and 6F6 lower cholesterol levels in mice in a dose-dependent fashion. Eight week old C57/bl6 mice (n=8/group) were administered the indicated doses of antibodies or saline on day 0 by i.p. bolus injection. Serum samples were collected and tested for cholesterol levels on day 7. In Figure 11A, the antibody 4A5 showed a graduated decrease in total serum cholesterol with increasing dose of antibody. In Figure 11B, the antibody 6F6 showed decrease in total serum cholesterol at 10 mg/kg/day.

Anti-PCSK9 antagonist antibodies 4A5, 5A10, 6F6 and 7D4 increase liver LDLR levels in mice as found by Western blot analysis. See Figure 12. For 4A5, 5A10 and 6F6, 8 week old C57/bl6 mice were administered with 10 mg/kg of antibodies or saline

on day 0 by i.v. bolus injection, animals were sacrificed on day 7, and whole liver lysate of 3 individual animals were analyzed for LDLR and GAPDH protein levels by Western. For 7D4, 8 week old BL6/c57 mice were administered with 10 mg/kg of antibodies on days 0, 1, 2, and 3 via i. p. bolus injection, animals were sacrificed on day 4, and whole liver lysate of 3 individual animals were analyzed for LDLR and GAPDH protein levels by Western blot. All antibody-treated mice showed high levels of LDLR as compared to the PBS control mice.

Figure 13 illustrates that anti-PCSK9 antagonist antibody has no effect in the LDLR^{-/-} mouse. Eight week old LDLR^{-/-} mice (LDLR KO mice) were administered 10 mg/kg 4A5 or saline on day 0 by i.p. bolus injection. Serum samples (from n = 9-10 mice) were collected and tested for cholesterol levels on day 7. Administration of the antibody did not appreciably alter the levels of total serum cholesterol, HDL, or LDL.

Figure 14 illustrates that multiple treatments of anti-PCSK9 antagonist antibodies in mice can substantially decrease total serum cholesterol. Eight week old C57/bl6 mice were administered the indicated doses of antibodies or PBS on days 0, 7, 14 and 21 by i.v. bolus injection. Serum samples (n = 5-11 mice) were collected and tested for cholesterol levels on day 28.

Example 8: PCSK9 Antagonist Antibodies Lower Serum LDL in Non-human Primates

To test the in vivo effect of antibodies to PCSK9, antibody 7D4 was tested in cynomolgus monkeys. Four 3-4 year old cynomolgus monkey were injected with vehicle (PBS+0.01 % Tween 20) on day 0, and 10 mg/kg 7D4 on day 7. Plasma lipid profiles were analyzed on days 0, 2, 7, 9, 11, 14, 21 and 28 following overnight fasting. A single injection of 10 mg/kg 7D4 produced a dramatic reduction in plasma LDL (60%) (Figure 15A) and LDL particle numbers (Figure 15D) in all 4 animals, while having minimal effect on their HDL levels (Figure 15B) and HDL particle numbers (Figure 15E). Total cholesterol (Figure 15C) was also reduced following 7D4 treatment, while triglyceride level (Figure 15F) was not significantly affected. Total 7D4 (G), and total PCSK9 levels (H) were also measured.

Figure 16 illustrates the dose-response of anti-PCSK9 antibody 7D4 on serum cholesterol levels in the cynomolgus monkey. Two male and two female cynomolgus monkeys 3-5 years of age in each group were given the indicated dose of 7D4 on day 7

and an equal volume of saline on day 0 by i.v. bolus injection. Plasma samples were taken at indicated time points and plasma LDL levels were measured.

Figure 17 illustrates a comparison of anti-PCSK9 antibodies 4A5, 5A10, 6F6 and 7D4 on serum cholesterol levels in the cynomolgus monkey. Two male and two female
5 cynomolgus monkeys 3-6 years of age in each group were given 1 mg/kg of the indicated antibody on day 0 by i.v. bolus injection. Plasma samples were taken at indicated time points, plasma LDL levels were measured and normalized to that on day - 2.

Figure 18 illustrates the effect of anti-PCSK9 antagonist antibody 7D4 on plasma
10 cholesterol levels of cynomolgus monkeys fed a 33.4% kcal fat diet supplemented with 0.1% cholesterol. Six 3-5 year old cynomolgus monkeys were put on high-fat diet for 16 weeks. Three monkeys were treated with 10 mg/kg 7D4 and three with saline on the indicated date. LDL levels of individual monkeys were measured and normalized to that of the treatment day.

Example 9: Humanized Anti-PCSK9 Antibody

The murine monoclonal antibody 5A10 was humanized and affinity matured to provide the L1L3 antibody. L1L3 has an affinity for murine PCSK9 of 200 pM and an affinity for human PCSK9 of 100 pM when measured by Biacore. L1L3 completely
20 inhibits the PCSK9-mediated down regulation of LDLR in cultured Huh7 cells when incubated with 100 nM human or murine PCSK9 antibody. See Figure 19.

Figure 20 illustrates the dose-response of L1L3, mouse precursor 5A10, and negative control antibody 42H7 to block the binding of recombinant biotinylated human PCSK9 and mouse PCSK9 to immobilized recombinant LDLR extracellular domain in
25 vitro. Figure 20A shows human PCSK9 binding to human LDLR extracellular domain at pH 7.5. Figure 20B shows human PCSK9 binding to human LDLR extracellular domain at pH 5.3. Figure 20C shows mouse PCSK9 binding to human LDLR extracellular domain at pH 7.5. Figure 20D shows mouse PCSK9 binding to human LDLR extracellular domain at pH 5.3.

Figure 21 shows the effect on serum cholesterol of treatment with 10 mg/kg L1L3
30 in mice. Two groups (n=8/group) of 8 week old C57/bl6 mice were dosed with 10 mg/kg L1L3 or an equal volume of saline by i. p. injection on day 0. Serum samples were collected and assayed for cholesterol levels on days 2, 4 and 7. L1L3 decreased total

serum cholesterol by about 40% at days 2 and 4. In another study, when 10 mg/kg of L1L3 was administered as a single intraperitoneal (IP) dose to C57BL/6 mice fed a normal diet (n=10), serum cholesterol levels were reduced by 47% compared to saline treated controls, 4 days post treatment. When L1L3 was administered as a single IP dose at 0, 0.1, 1, 10 and 80 mg/kg (n=6/group) in a dose-response experiment in male Sprague-Dawley rats fed a normal diet, serum cholesterol levels were dose-dependently reduced, with maximum effect of 50% seen at 10 and 80 mg/kg, 48 hours post dosing. The duration of the cholesterol repression was also dose dependent, ranging from 1 to 21 days.

The amino acid sequence of L1L3 fully humanized heavy chain (SEQ ID NO:15) is shown in Table 8. The sequence of the variable region is underlined (SEQ ID NO: 54).

Table 8

	<u>qvqlvqsgae</u>	<u>vkkgqasvk</u>	<u>sckasqytft</u>	<u>syymhwvrqa</u>	<u>pggglewmge</u>
15	<u>ispfggrtny</u> 60				
	<u>nekfksrvtm</u>	<u>trdtststvy</u>	<u>melsslrsed</u>	<u>tavyycarer</u>	<u>plyasdlwgg</u>
	<u>gttvtvssas</u> 120				
	tkgpsvfpla	pcsrstsest	aalgclvkdy	fpepvtvsw	sgaltsgvht
	fpavqlqssgl 180				
20	yslssvvtvp	ssnfgtqtyt	cnvdhkpsnt	kvdktverkc	cvecppcpap
	<u>pvpkpsvflf</u> 240				
	<u>ppkpkdtlmi</u>	<u>srtpevtcvv</u>	<u>vdvshedpev</u>	<u>qfnwyvdgve</u>	<u>vhnaktkpre</u>
	<u>eqfnstfrvv</u> 300				
	<u>svltvvhqdw</u>	<u>lngkeykckv</u>	<u>snkglpssie</u>	<u>ktisktkgqp</u>	<u>repqvytlpp</u>
25	<u>sreemtknqv</u> 360				
	<u>sltclvkgyf</u>	<u>psdiavewes</u>	<u>ngqpennykt</u>	<u>tppmldsdgs</u>	<u>fflyskltvd</u>
	<u>ksrwqqgnvf</u> 420				
	<u>scsvmhealh</u>	<u>nhytqksls</u>	<u>spgk</u> 444		

The amino acid sequence of L1L3 fully humanized light chain (SEQ ID NO:14) is shown in Table 9. The variable region is underlined (SEQ ID NO: 53).

Table 9

	<u>diqmtqspss</u>	<u>lsasvqdrvt</u>	<u>itcrasqgis</u>	<u>salawyqqkp</u>	<u>gkapklliys</u>
	<u>asyrytgvp</u> 60				
35	<u>rfsqsgsgtd</u>	<u>ftftisslqp</u>	<u>ediatyyccg</u>	<u>ryslwrtfgg</u>	<u>gtkleikrtv</u>
	<u>aapsvfifpp</u> 120				

sdeqlksgta svvc1lnnfy preakvqwkv dnalqsgnSq esvteqdskd
styslsstlt 180
lskadyekhk vyacevthqg lsspvtksfn rgec 214

5 Figure 22 shows the effect of intravenous administration of an effective dose (3 mg/kg) of antibody 5A10 (solid circles) or antibody L1L3 (solid squares) to each of four cynomolgus monkeys at day zero. The change in serum HDL (Figure 22A) and serum LDL (Figure 22B) was measured from -2 to +28 days. Both antibodies resulted in greater than about 70% decrease in serum LDL levels by about seven days, an effect
10 that substantially persisted for about six more days in the animals administered L1L3. All the animals showed normal liver and kidney function and near-normal hematocrits.

 L1L3 dose-dependently reduced LDL-C, with a maximum effect observed in the 10 mg/kg group, which maintained a 70% reduction in LDL-C levels until day 21 post-dosing, and fully recovered by day 31. HDL-C levels were not affected by L1L3
15 treatment in all dose groups. The animals in the 3 mg/kg dose group (n=4) were also given two additional IV doses of 3 mg/kg L1L3 on study days 42 and 56 (2-weeks apart). These two additional doses again lowered LDL-C and maintained LDL-C levels below 50% for 4 weeks. LDL-C levels returned to normal two weeks later. Serum HDL-C levels remained unchanged throughout the study.

20 The efficacy of L1L3 in non-human primates with hypercholesterolemia and pharmacodynamic interactions between L1L3 and HMG-CoA reductase inhibiting statins were investigated. Prior to the initiation of the study, the LDL-C levels of a cohort of cynomolgus monkeys (n=12) were elevated to an average of 120 mg/dL, compared to the normal average levels of 50 mg/dL, by feeding with a diet containing 35% fat (wt/wt)
25 and 600 ppm cholesterol for over 18 months. Surprisingly, no effect was observed on serum total cholesterol or LDL-C levels after the daily administration of a medium-dose (10 mg/animal) of Crestor® (rosuvastatin calcium) for 6 weeks, and after a subsequent daily administration of high-dose (20 mg/kg) for 2 weeks. A single administration of 3 mg/kg L1L3 with Crestor® or vehicle treatment for 2 weeks, effectively lowered serum
30 LDL-C levels by 56% by day 5 post treatment, and gradually recovered in 2.5 to 3 weeks while not affecting HDL-C levels. Upon switching the animals to daily administration of 50 mg/kg Zocor® (simvastatin), their LDL-C levels reached a maximal reduction of 43% at day 5, and stabilized thereafter. After 3 weeks of 50mg/kg/day

56
56

Zocor[®] administration, these animals were treated with a single dose of 3mg/kg L1L3 while still receiving 50mg/kg/day Zocor[®]. Administration of L1L3 resulted in another additional 65% reduction in LDL-C, in addition to the 43% reduction by Zocor[®], by day 5, and returned to pre-dosing levels within 2 weeks.

5 Other CDR amino acid substitutions were made to 5A10 in the course of humanization and affinity maturation and to achieve particular properties. The sequences of the modified CDRs and the PCSK9 binding abilities of the antibodies containing these modified CDRs are listed in Figures 24 A-G. The numbers following each sequence in Figures 24 A-G represent the SEQ ID NO for that sequence.

10

The disclosures of all references cited herein are hereby incorporated by reference herein.

It is claimed:

1. An antagonist of PCSK9 which comprises an isolated antibody, a peptide, or an aptamer which interacts with PCSK9 and, when administered to a subject, lowers the blood low density lipoprotein (LDL) cholesterol in said subject.
2. An isolated anti-PCSK9 antibody which specifically binds to PCSK9 and which is a full antagonist of the PCSK9-mediated effect LDL receptor (LDLR) levels as measured in vitro using an LDLR down-regulation assay in Huh7 cells.
3. An isolated antibody which antagonizes the extracellular interaction of PCSK9 with LDLR, as measured by PCSK9 binding to the LDLR in vitro, and, when administered to a subject, lowers the blood LDL cholesterol in said subject.
4. The antibody of claims 2 or 3, wherein the antibody is humanized, human, or chimeric.
5. The antibody of claim 2, wherein the antibody recognizes an epitope on human PCSK9 comprising amino acid residues 153-155, 194, 195, 197, 237-239, 367, 369, 374-379 and 381 of the PCSK9 amino acid sequence of SEQ ID NO: 53.
6. The antibody of claim 5, wherein the antibody epitope on human PCSK9 does not comprise one or more of amino acid residues 71, 72, 150-152, 187-192, 198-202, 212, 214-217, 220-226, 243, 255-258, 317, 318, 347-351, 372, 373, 380, 382, and 383 of the PCSK9 amino acid sequence of SEQ ID NO: 53.
7. The antibody of claim 3, wherein the antibody recognizes an epitope on human PCSK9 that overlaps with more than about 75% of the surface on PCSK9 that interacts with the EGF-like domain of the LDLR.
8. An isolated antibody that comprises a PCSK9 binding region that competes with, or recognizes a first epitope of PCSK9 that overlaps with a second epitope that is recognized by, a monoclonal antibody selected from the group consisting of 5A10, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession number PTA-8986; 4A5, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession number PTA-8985; 6F6, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and

assigned accession number PTA-8984, and 7D4, which is produced by a hybridoma cell line deposited with the American Type Culture Collection and assigned accession number PTA-8983.

- 5 9. An isolated antibody which specifically binds to PCSK9 and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:8, 59, or 60, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:9 or 61, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.
- 10 10. An isolated antibody comprising a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:11, a VL CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12, and/or VL CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:13, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.
- 15 11. The antibody of claim 10 further comprising a VH CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:59 or 8, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:61 or 9, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.
- 20 12. The antibody of claim 11, wherein the variant of the VH CDR1 comprises a substitution at amino acid position 8 of SEQ ID NO:59, a variant of the VH CDR2 comprises a substitution at one or more of amino acid positions 3, 4, 5, 6, and 7 of SEQ ID NO:9, and/or a variant of the VH CDR3 comprises a substitution at one or both of amino acid positions 7 and 9 of SEQ ID NO: 10.
- 25 13. The antibody of claim 11, wherein the VH region comprises SEQ ID NO: 54 and the VL region comprises SEQ ID NO: 53.
- 30 14. A humanized antibody consisting of a light chain having SEQ ID NO:14, a heavy chain having SEQ ID NO:15, with or without the C-terminal lysine of SEQ ID NO: 15, or both a light chain having SEQ ID NO:14 and a heavy chain having SEQ ID NO:15, with or without the C-terminal lysine of SEQ ID NO: 15.

15. The antibody of claim 14, wherein the antibody further comprises an immunologically inert constant region.

16. The antibody of claim 15, wherein the antibody has an isotype that is selected from the group consisting of IgG₂, IgG₄, IgG_{2Δa}, IgG_{4Δb}, IgG_{4Δc}, IgG₄ S228P, IgG_{4Δb} S228P and IgG_{4Δc} S228P.

17. The antibody of claim 16, wherein the constant region is aglycosylated Fc.

18. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the antibody of claim 2.

19. The pharmaceutical composition of claim 18, further comprising a therapeutically effective amount of a statin.

20. A host cell that recombinantly produces the antibody of claim 2.

21. An isolated nucleic acid encoding the antibody of claim 2.

22. A method for reducing a level of LDL-cholesterol in blood of a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the antibody of claim 2.

23. A cell line that recombinantly produces a PCSK9 antibody or antigen-binding portion thereof, wherein the cell line is selected from the group consisting of:

- a) 4A5 having an ATCC Accession No. of PTA-8985;
- b) 5A10 having an ATCC Accession No. of PTA-8986;
- c) 6F6 having an ATCC Accession No. of PTA-8984; and
- d) 7D4 having an ATCC Accession No. of PTA-8983.

24. A cell line that recombinantly produces an antibody which specifically binds to PCSK9 and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:8, 59, or 60, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:9 or 61, and/or VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:10, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3, and/or comprises a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID

NO:11, a VL CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:12, and/or VL CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:13, or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

FIG. 1A

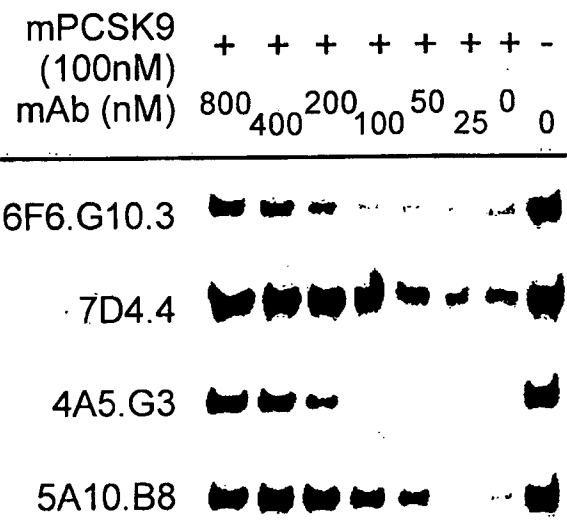


FIG. 1B

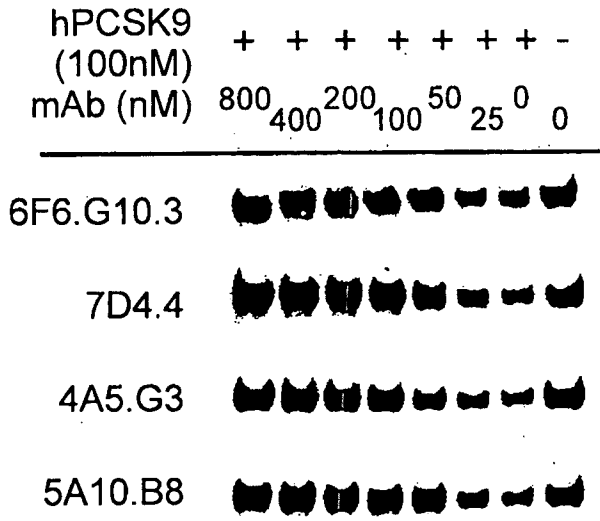
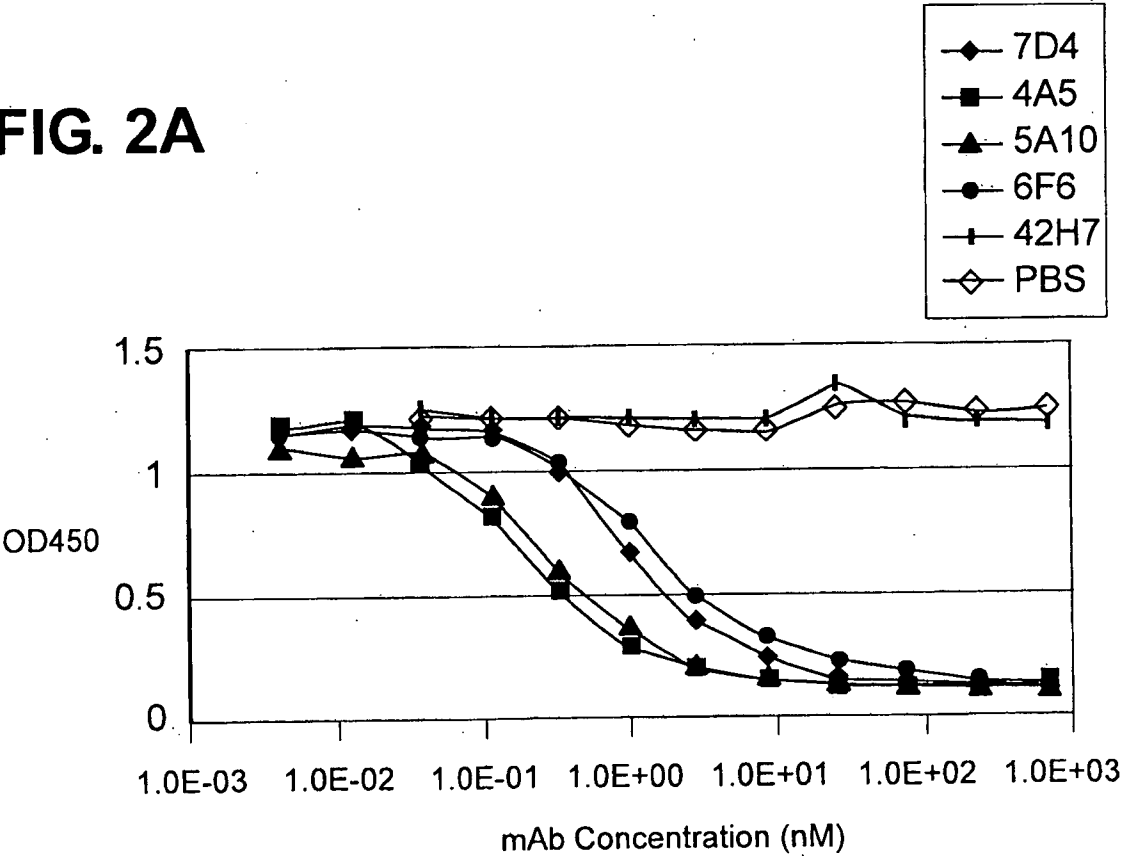


FIG. 2A



2/26

FIG. 2B

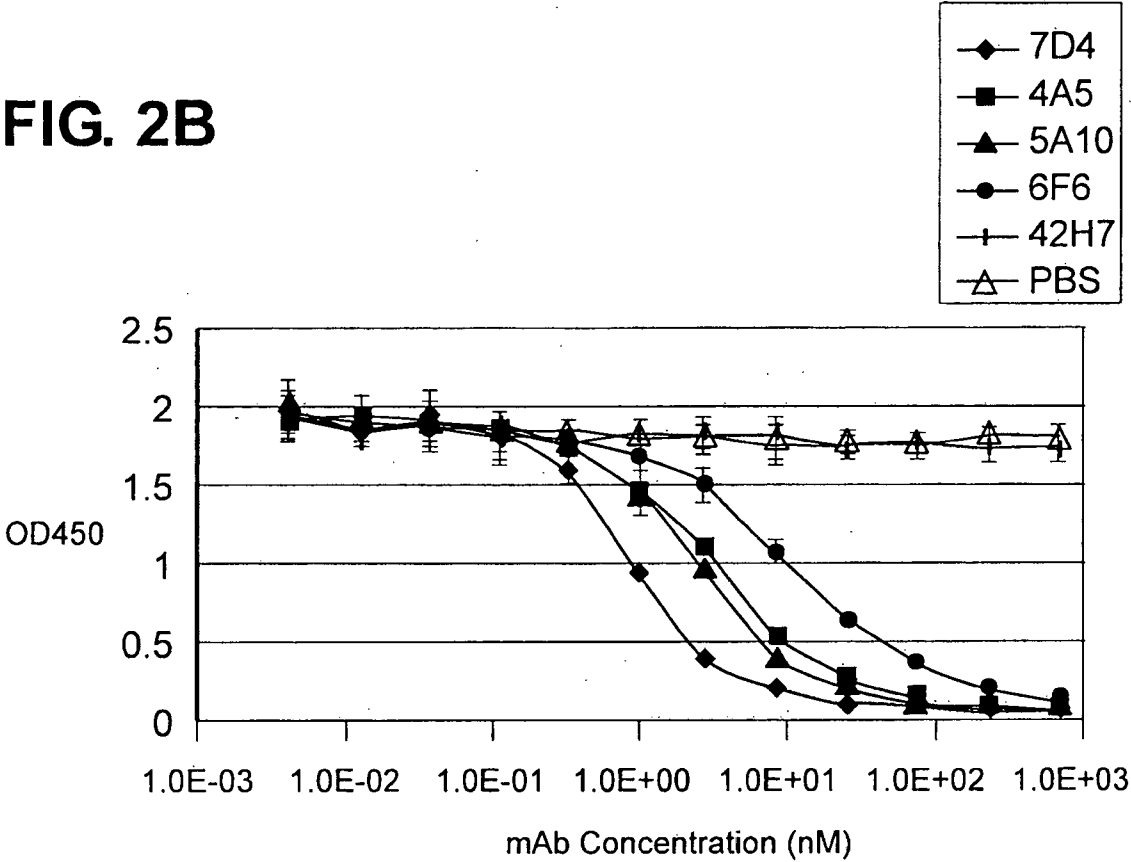


FIG. 3

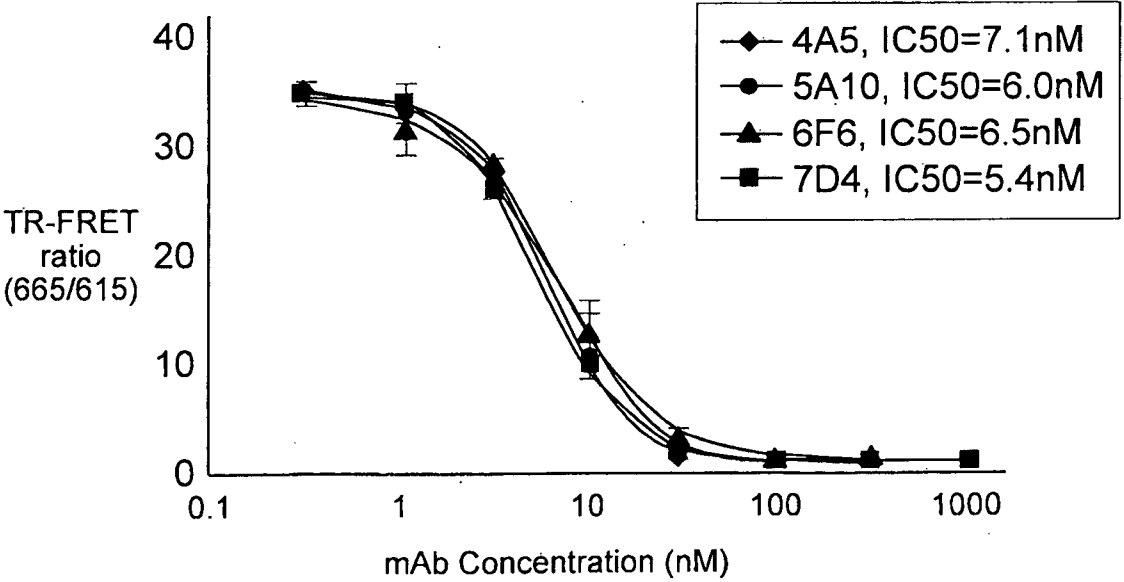
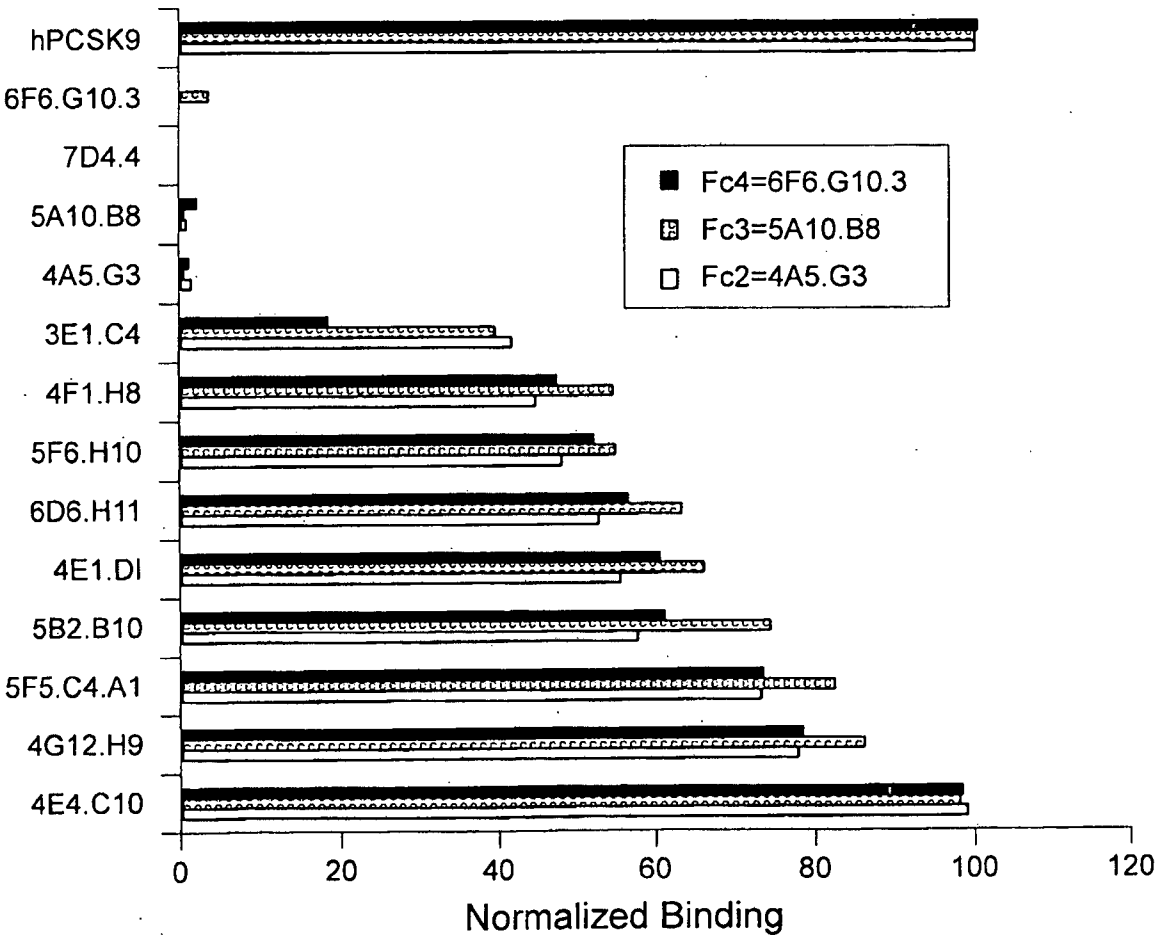


FIG. 4A

mAb	Epitope
3E1	ERITTPRY
4F1	SIPWNLERITPPRYRADE YQPPDG
5F6	Unknown, group 2
6D6	Unknown, group 1
4E1	Unknown
15F5	QEDEDGDYEELVLALRSEEDG LAEA
4G12	Unknown, group 1
4E4	AKDVINEAWFPEDQQRVLTPNL
4A5	Unknown, group 4
5A10	Unknown, group 4
6F6	Unknown, group 4
7D4	Unknown, group 4

FIG. 4B



4/26

FIG. 5

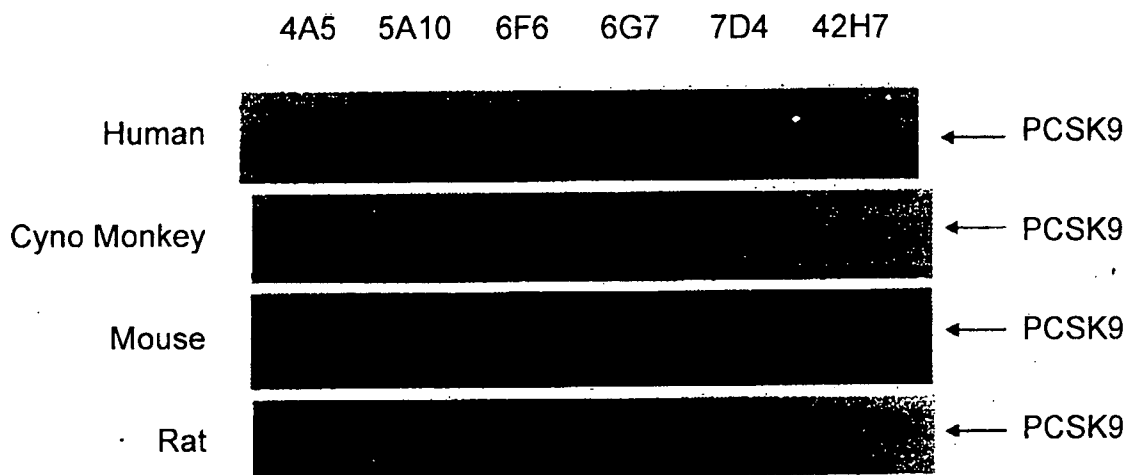
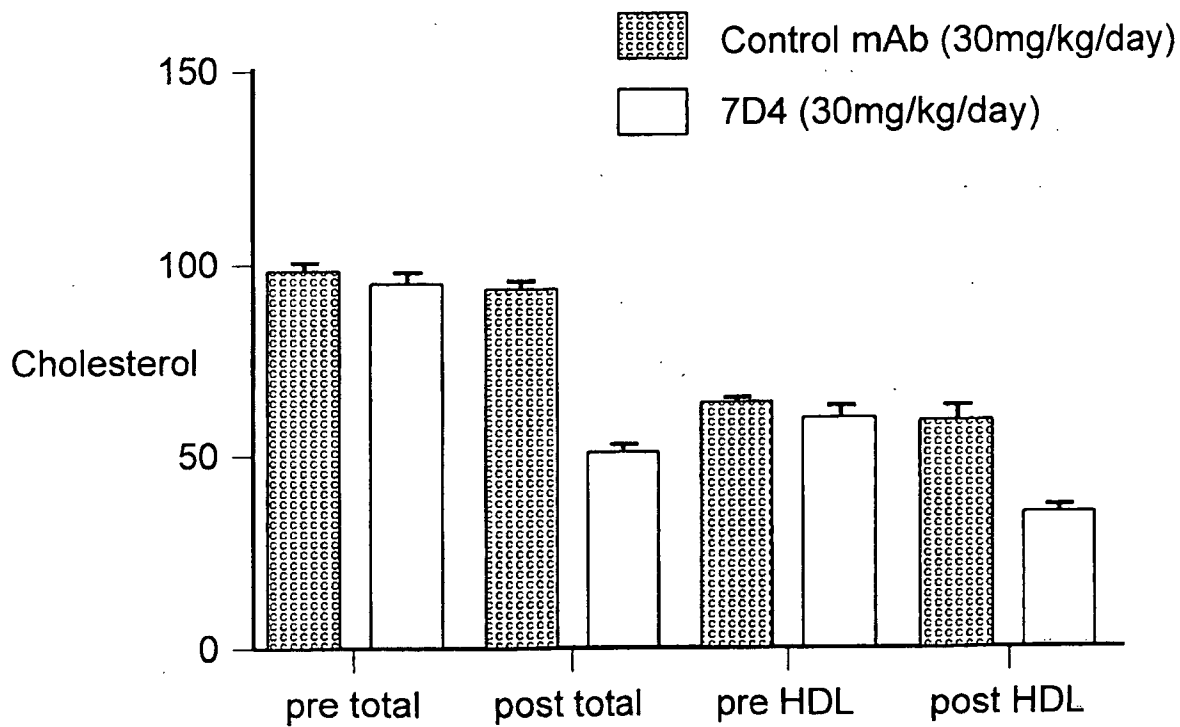


FIG. 6



5/26

FIG. 7A

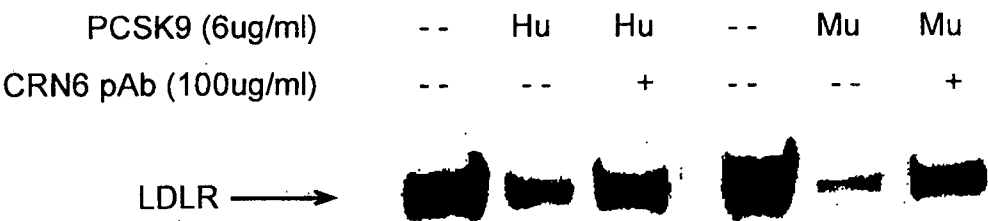
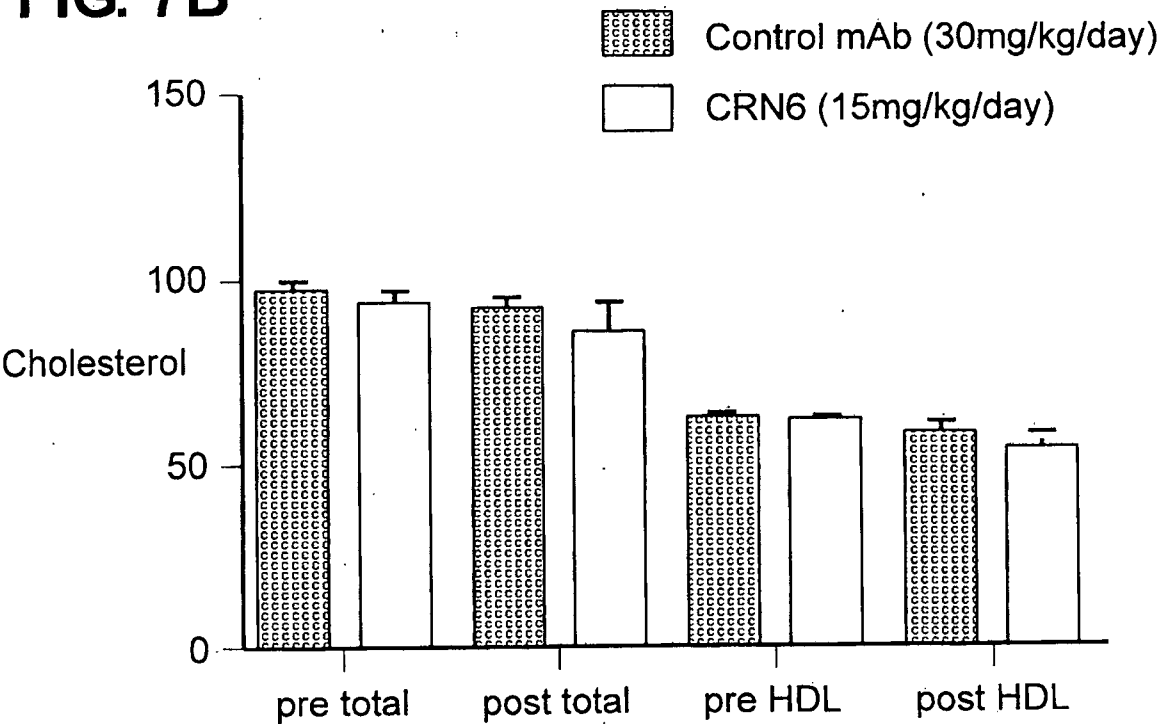


FIG. 7B



6/26

FIG. 8A

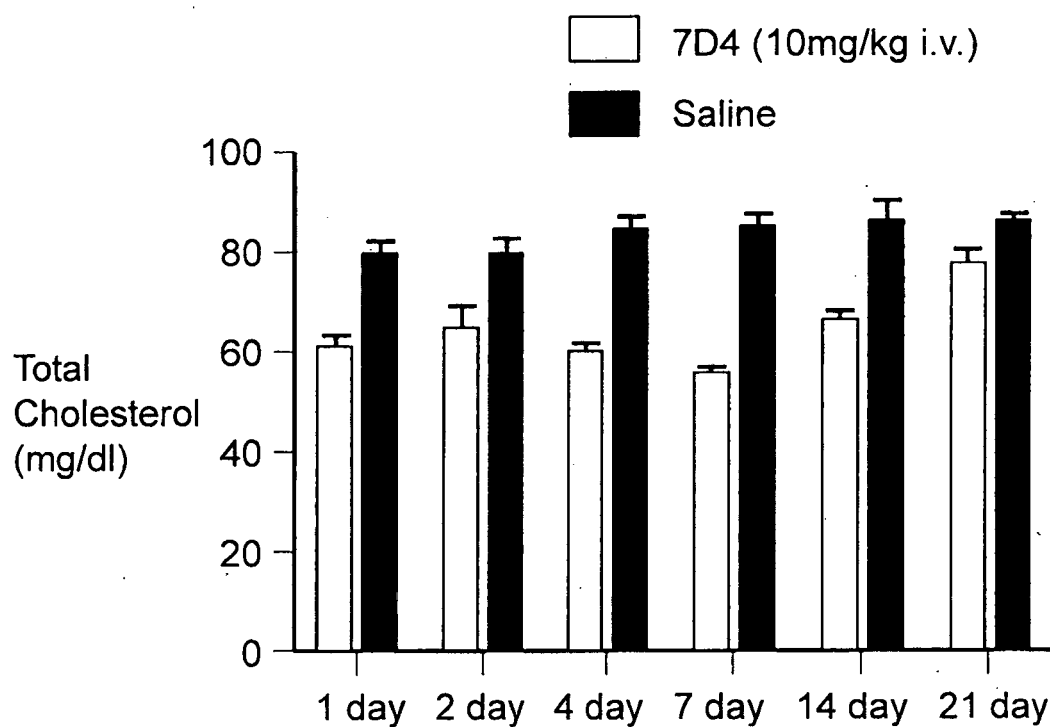
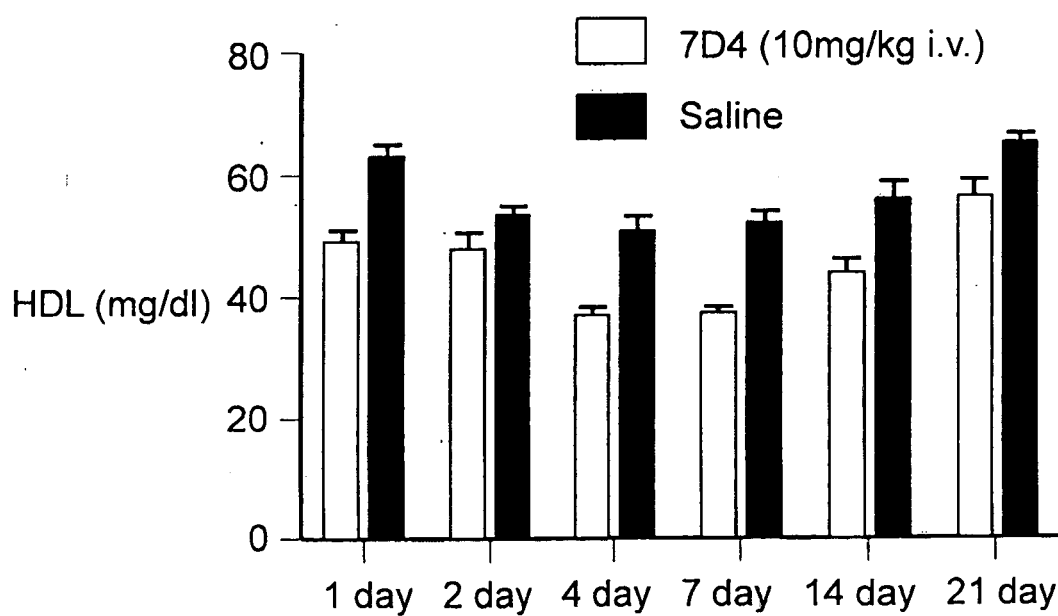


FIG. 8B



7/26

FIG. 9A

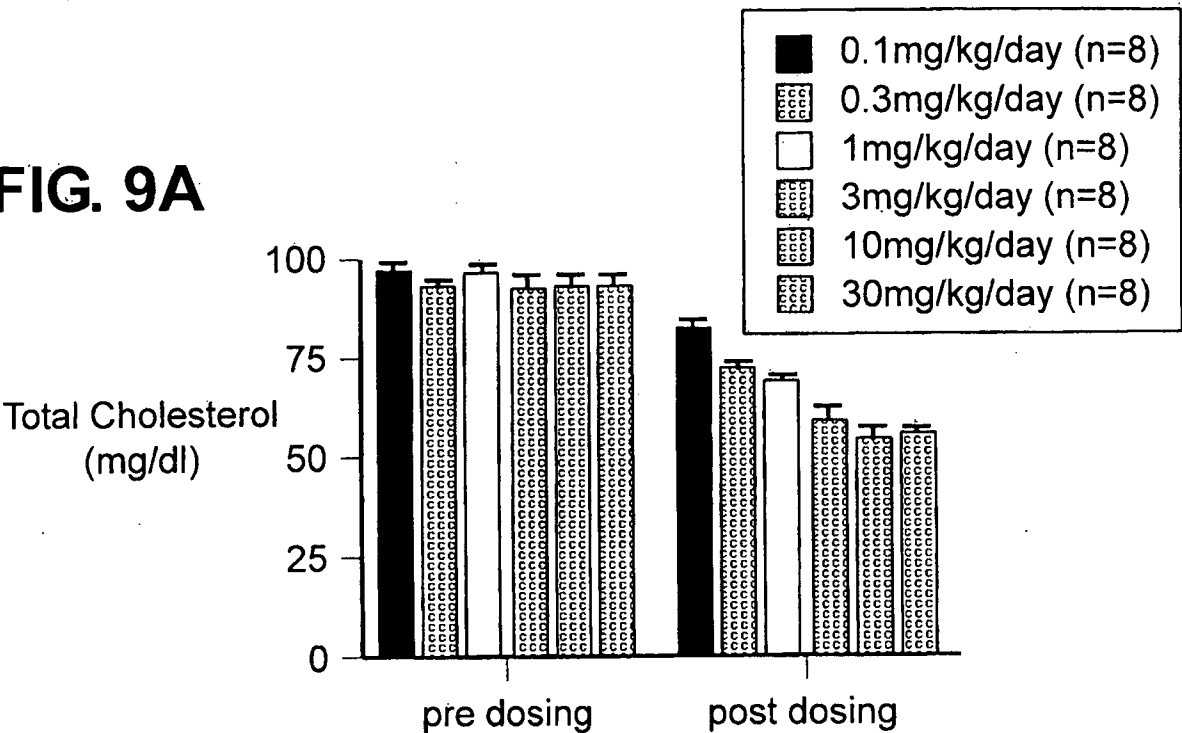


FIG. 9B

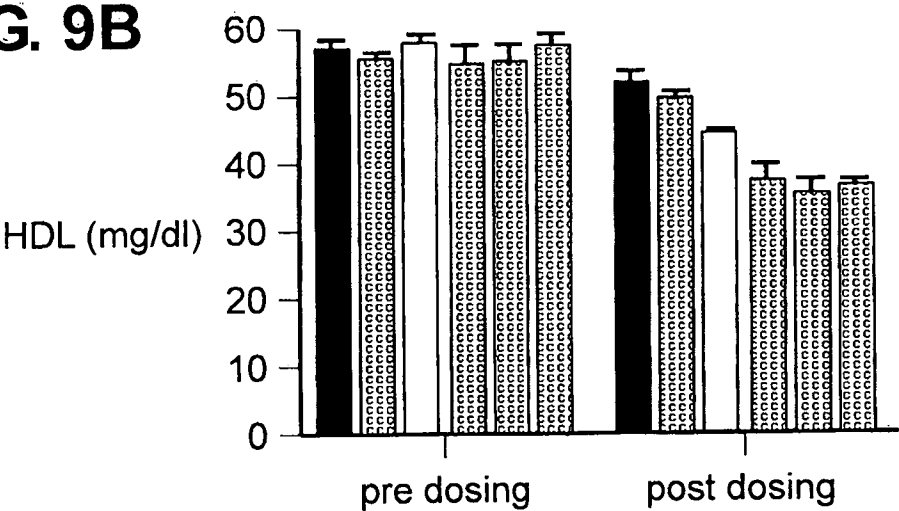
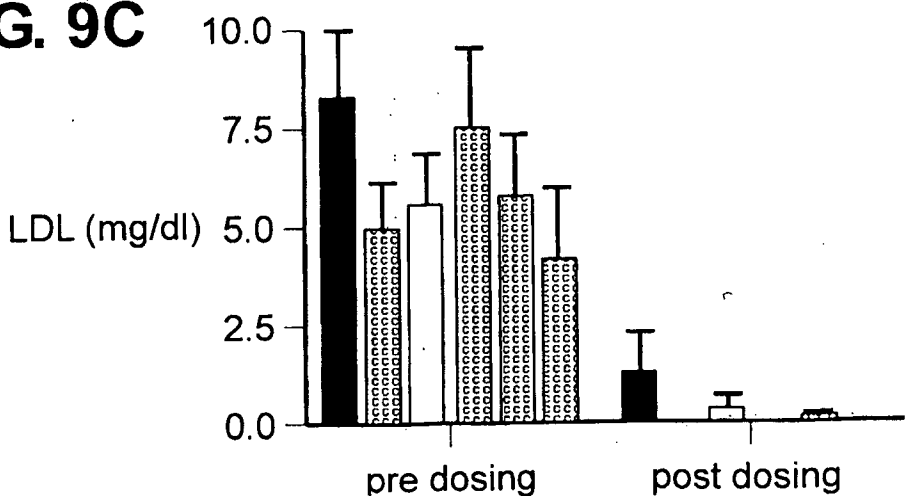


FIG. 9C



8/26

FIG. 10A

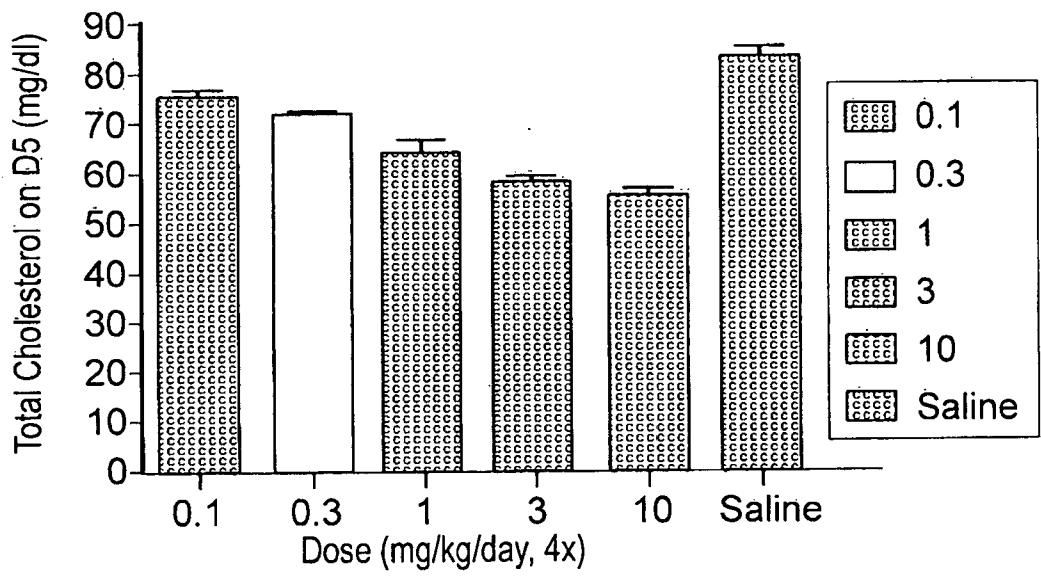
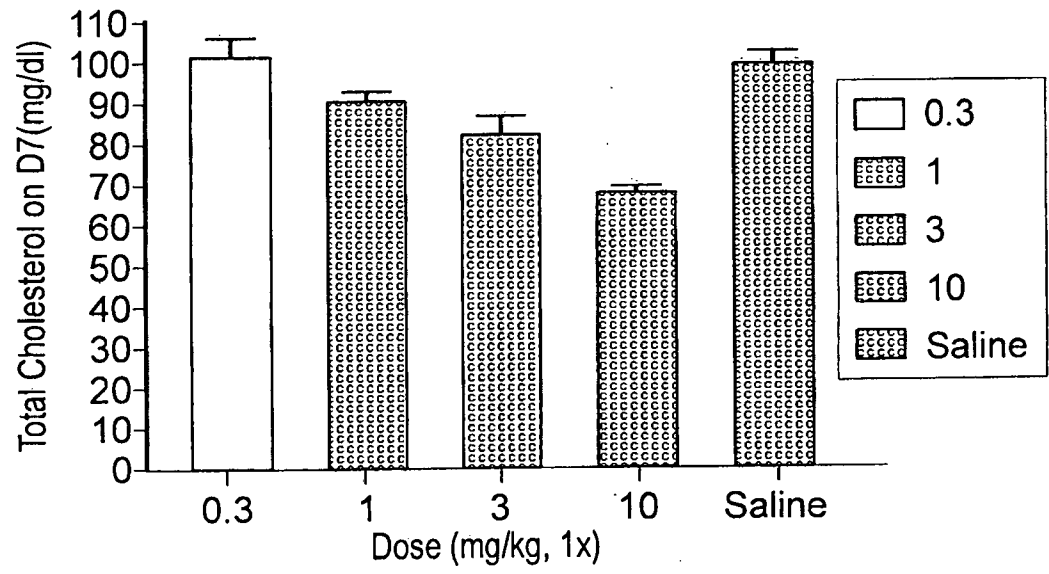


FIG. 10B



9/26

FIG. 11

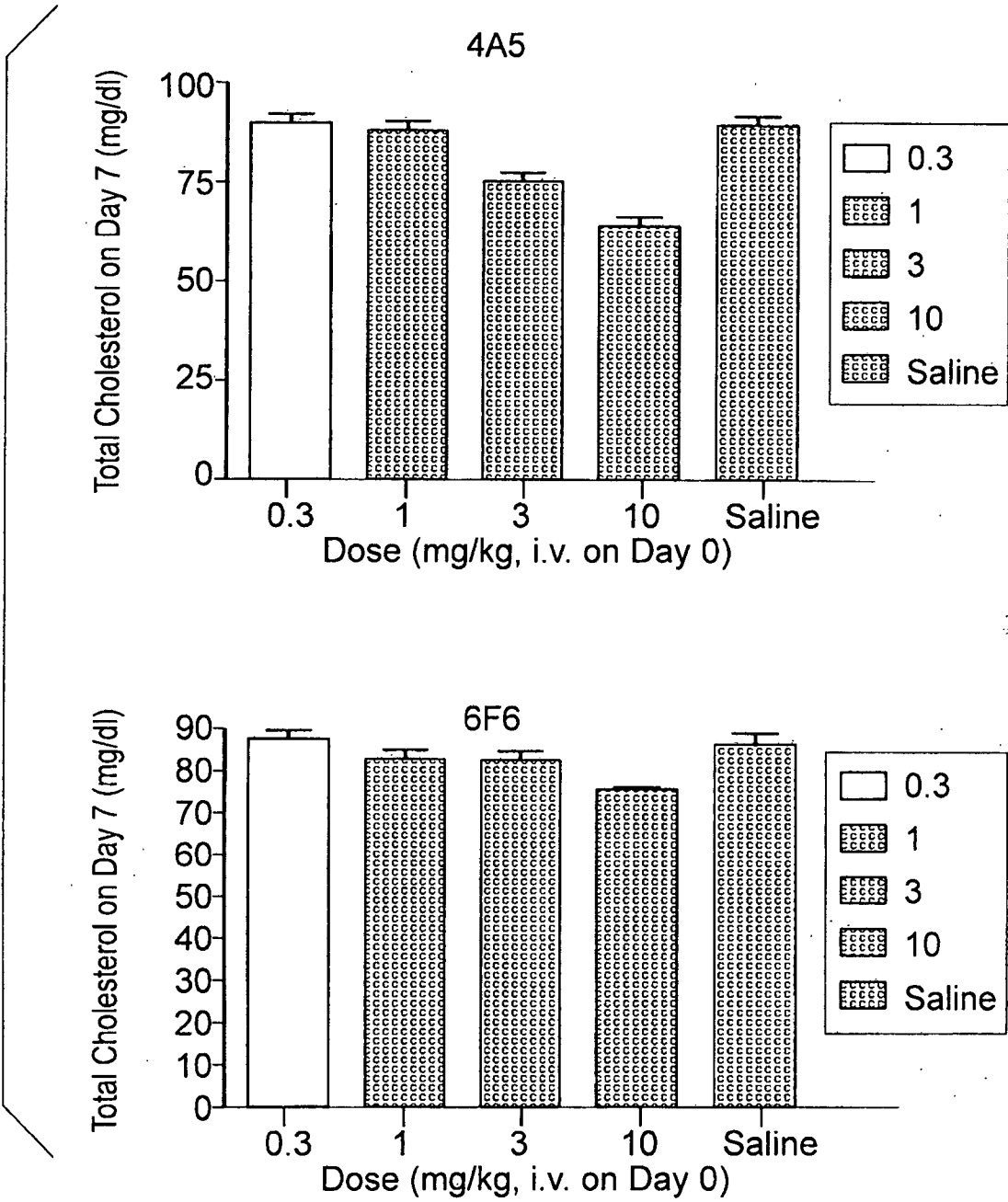
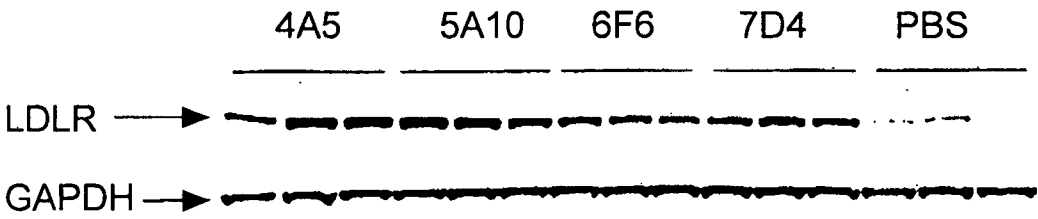


FIG. 12



10/26

FIG. 13

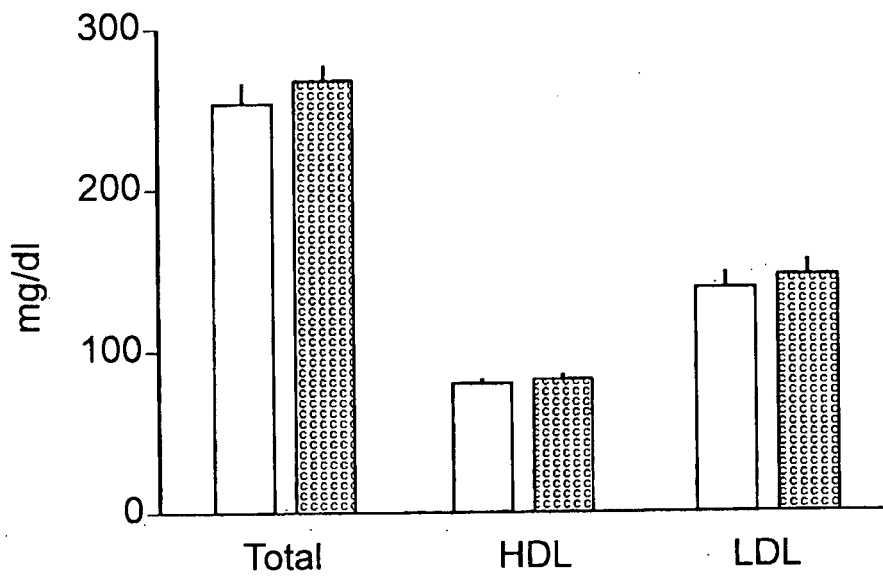
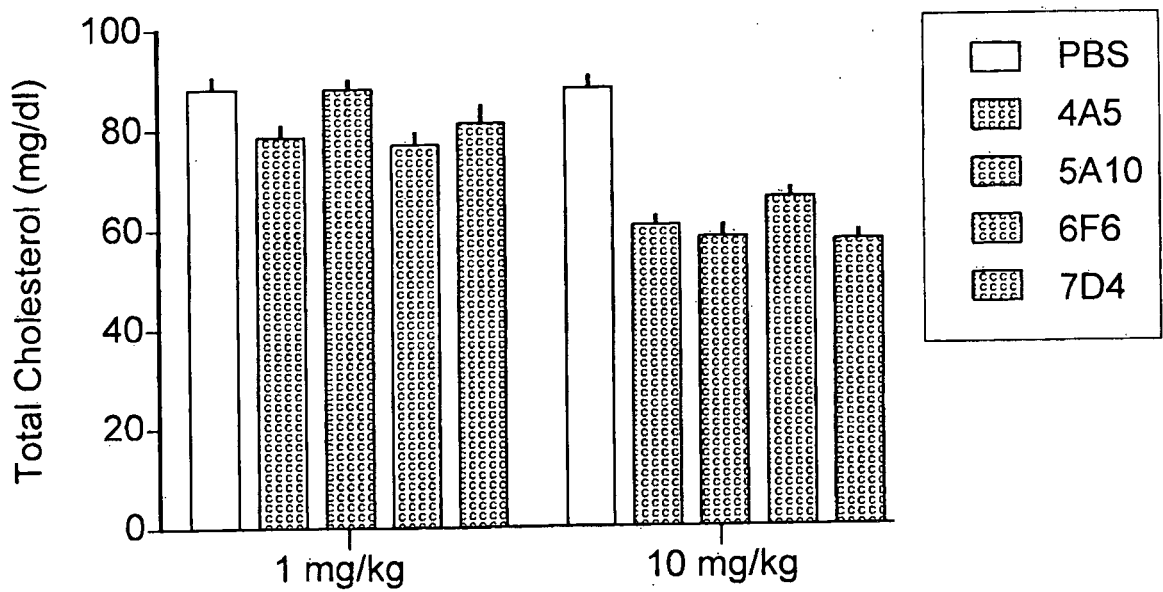


FIG. 14



11/26

FIG. 15B

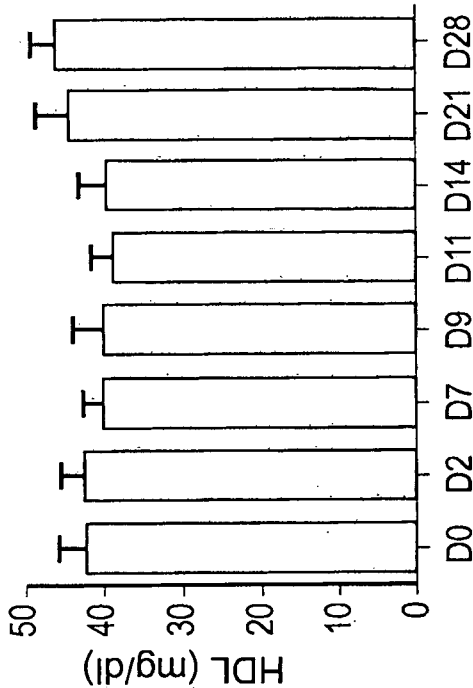


FIG. 15D

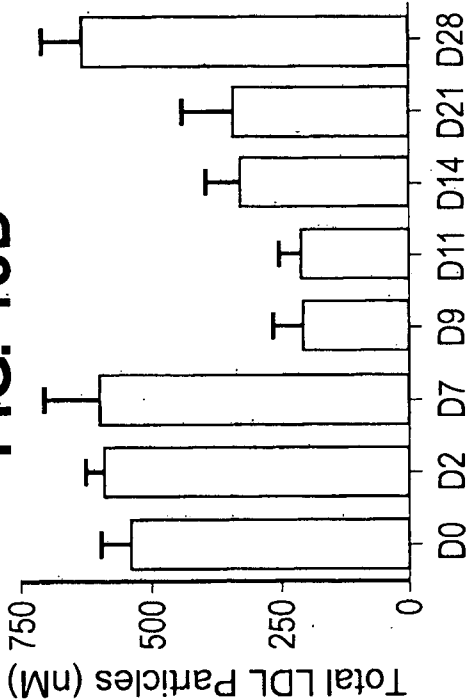


FIG. 15A

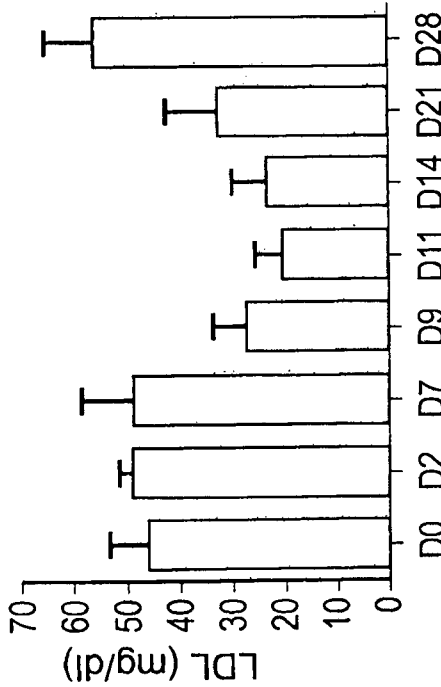
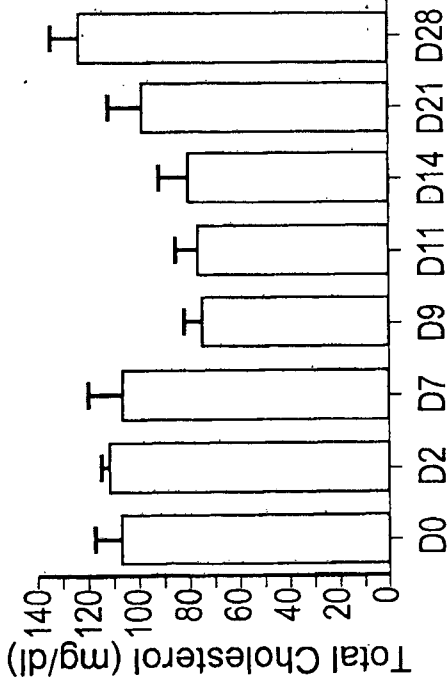


FIG. 15C



12/26

FIG. 15F

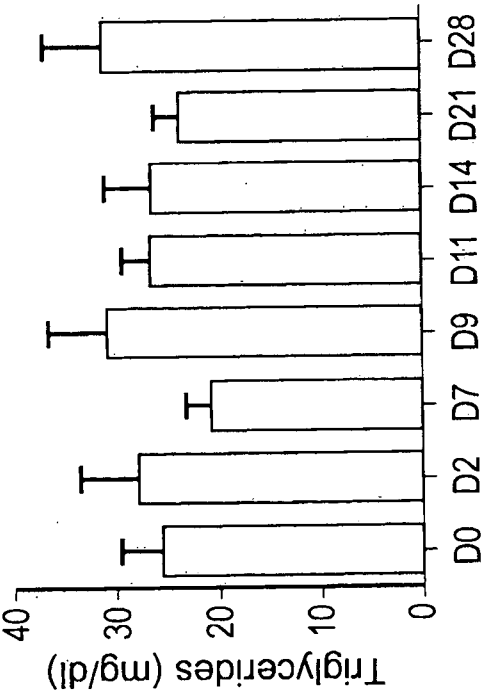


FIG. 15H

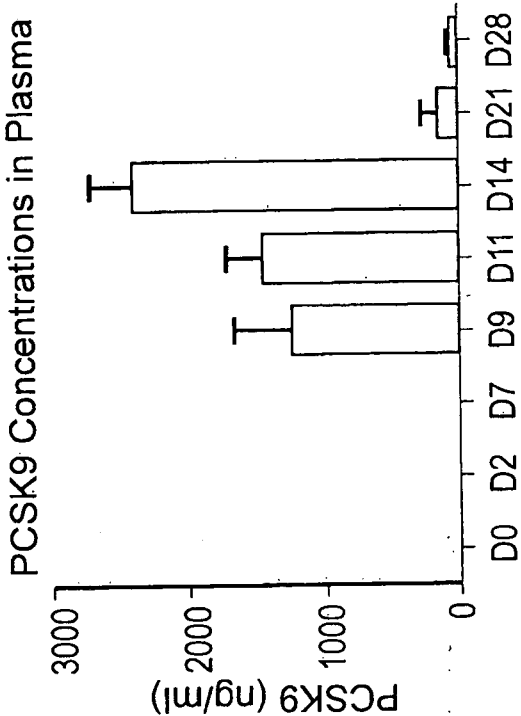


FIG. 15E

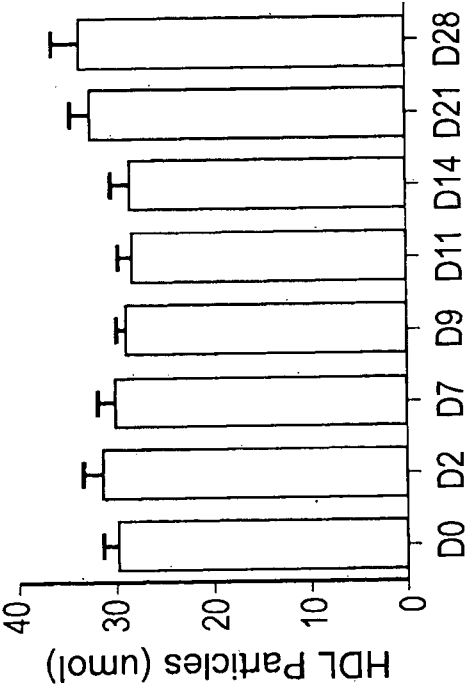


FIG. 15G

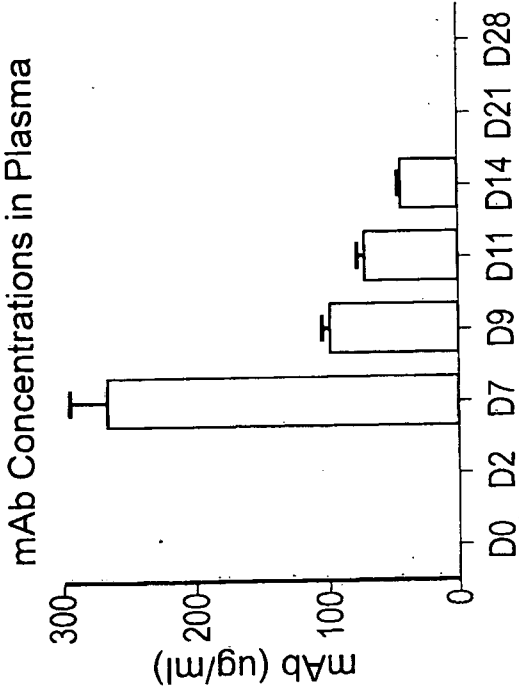
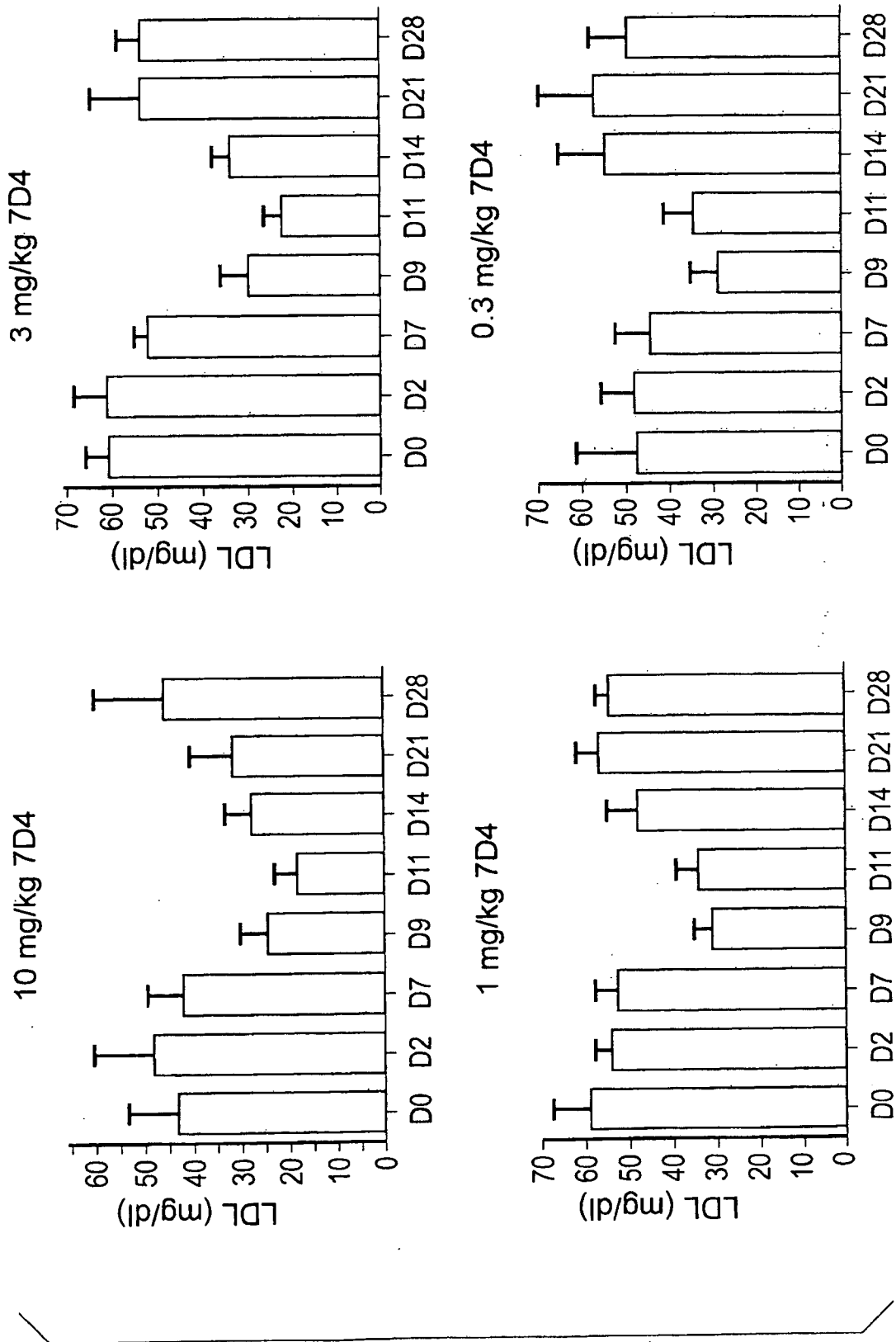


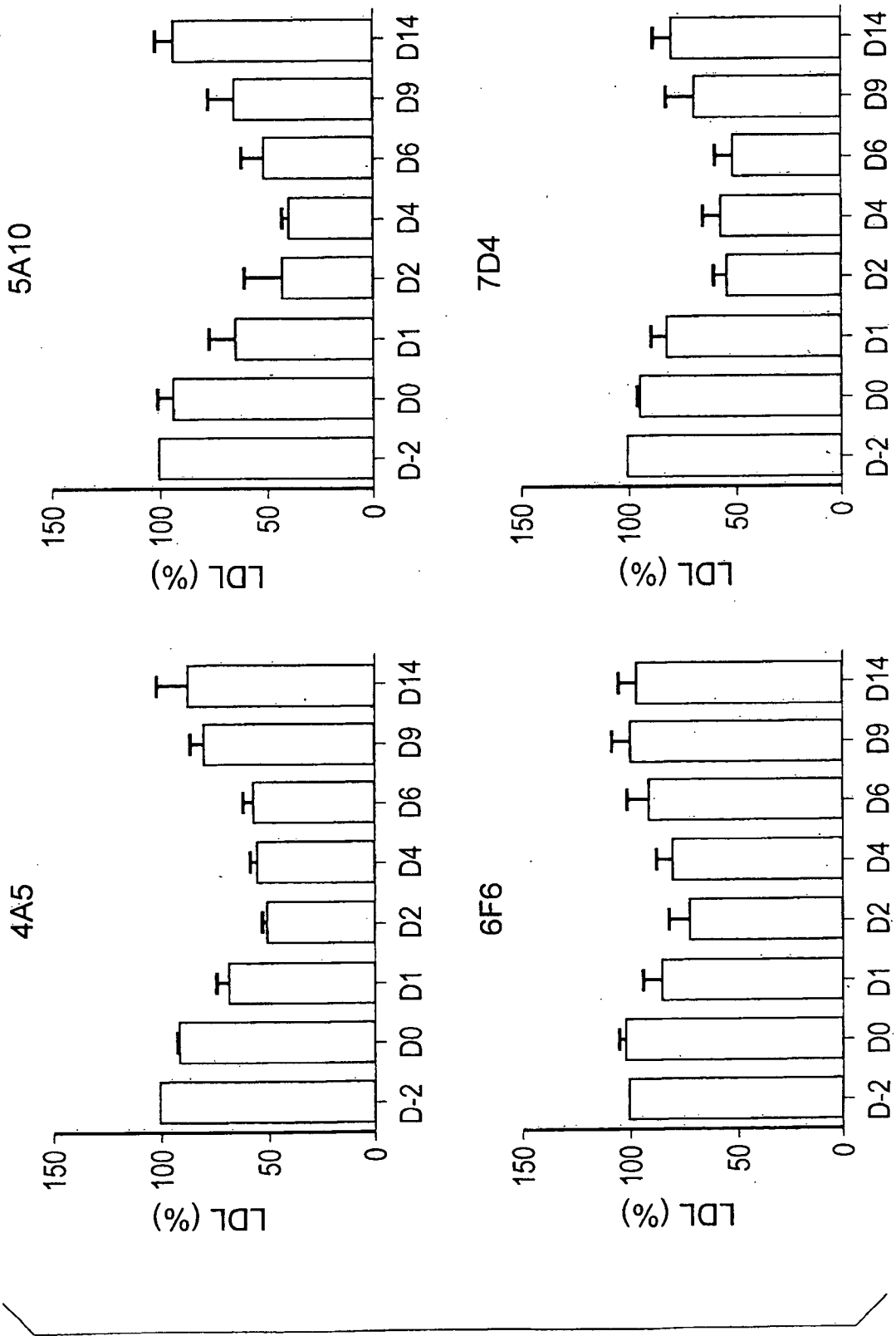
FIG. 16



65
62

14/26

FIG. 17



15/26

FIG. 18

33.4% Kcal fat, 0.1% cholesterol diet

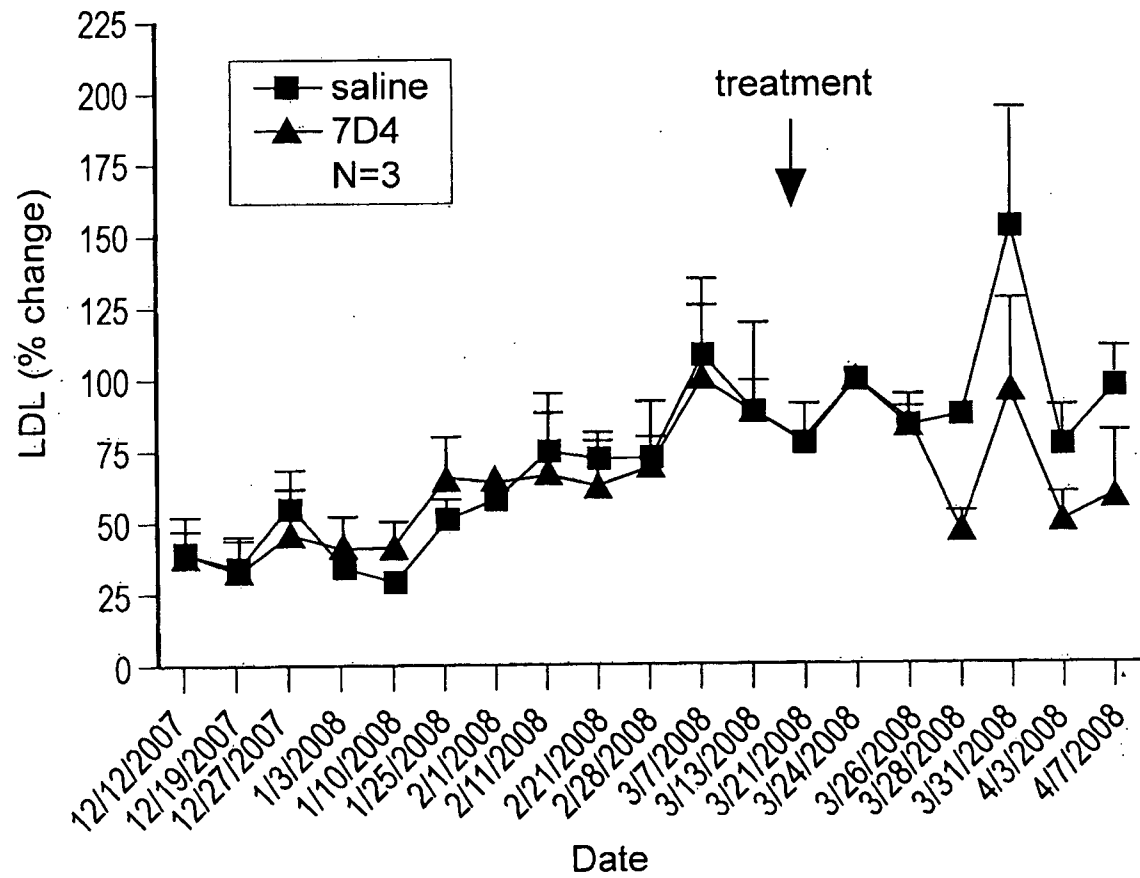
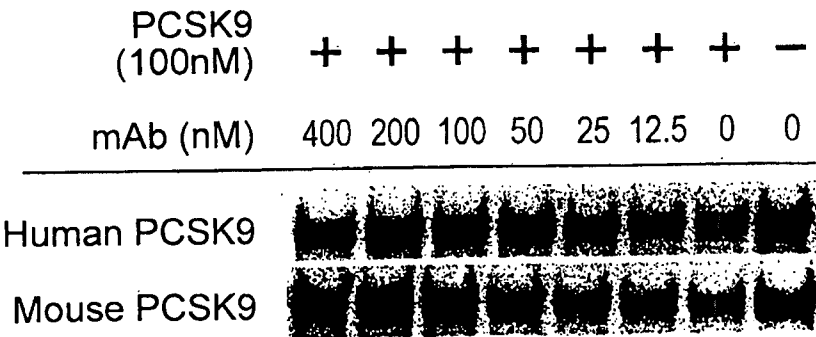
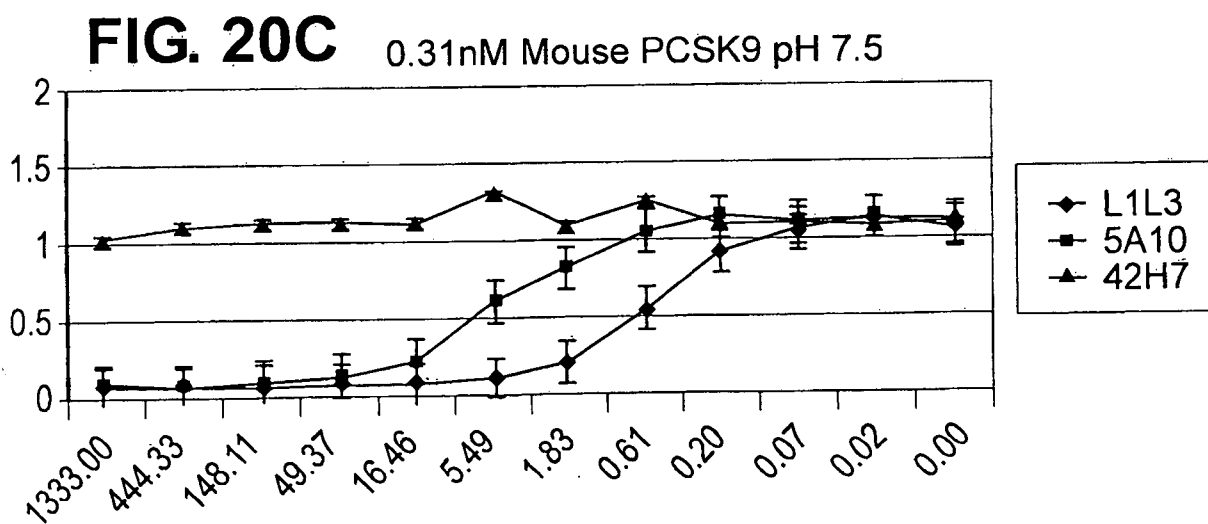
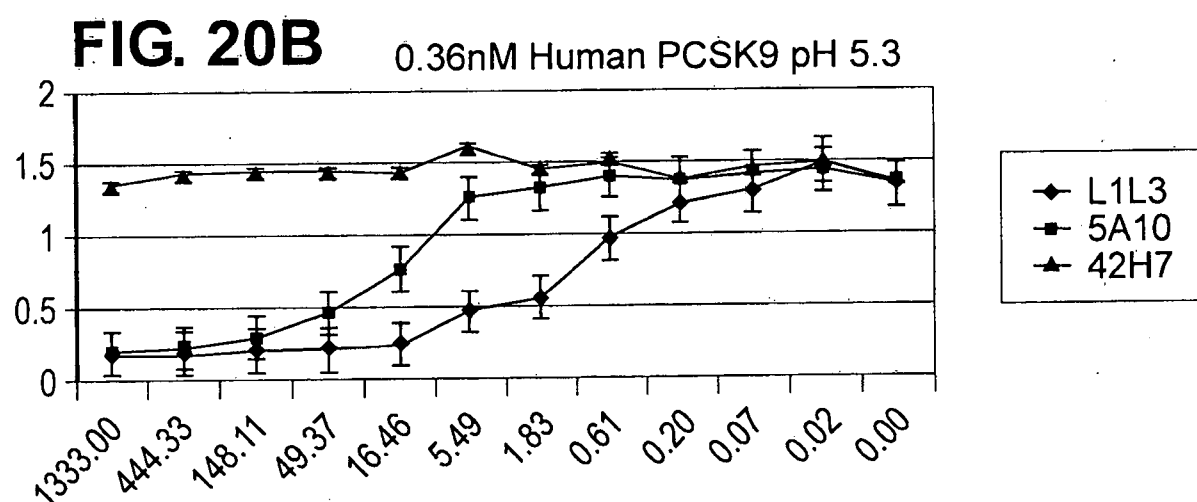
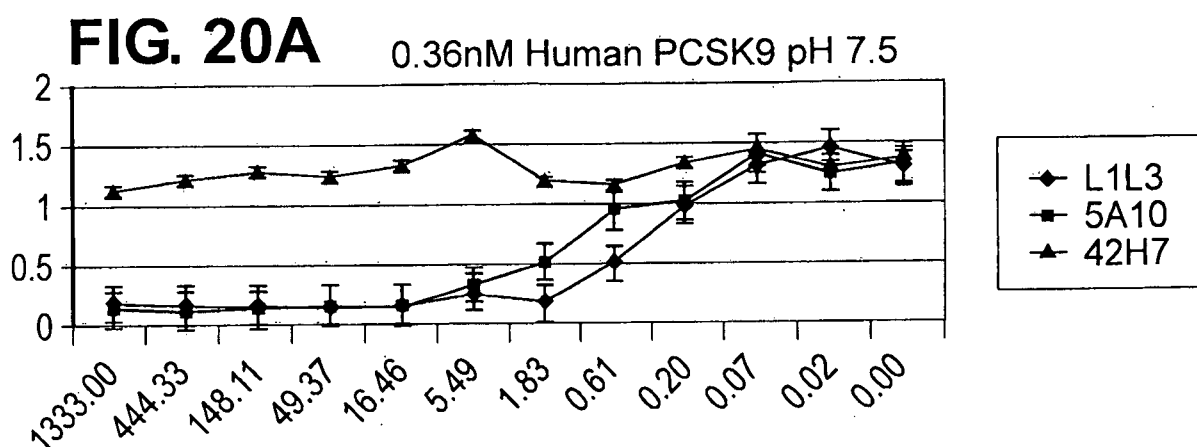
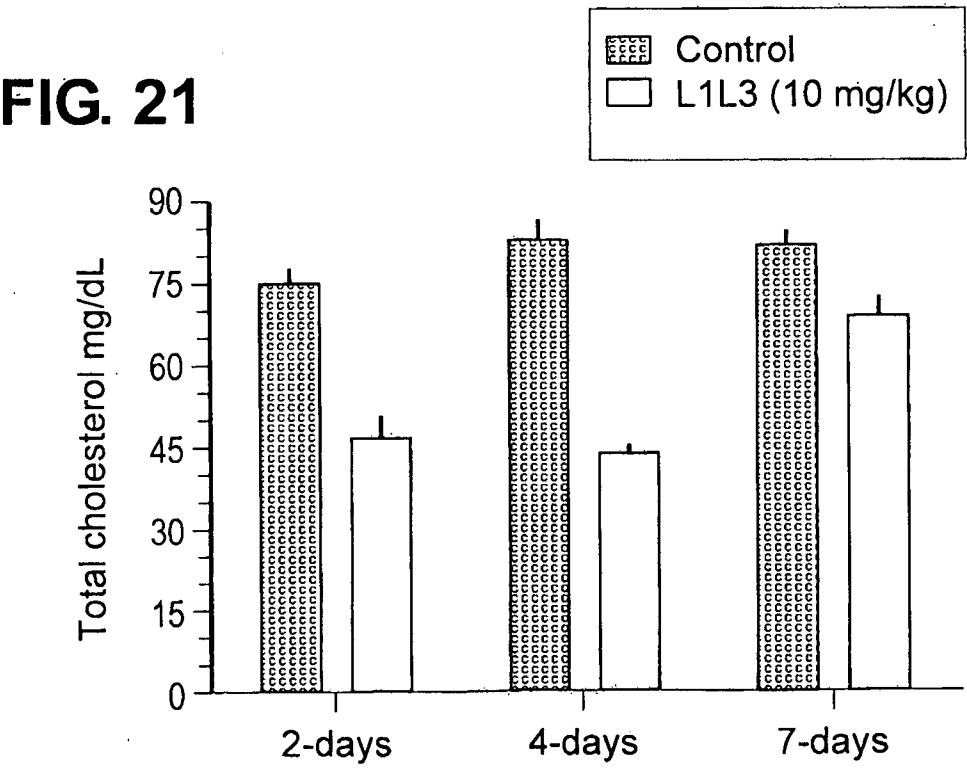
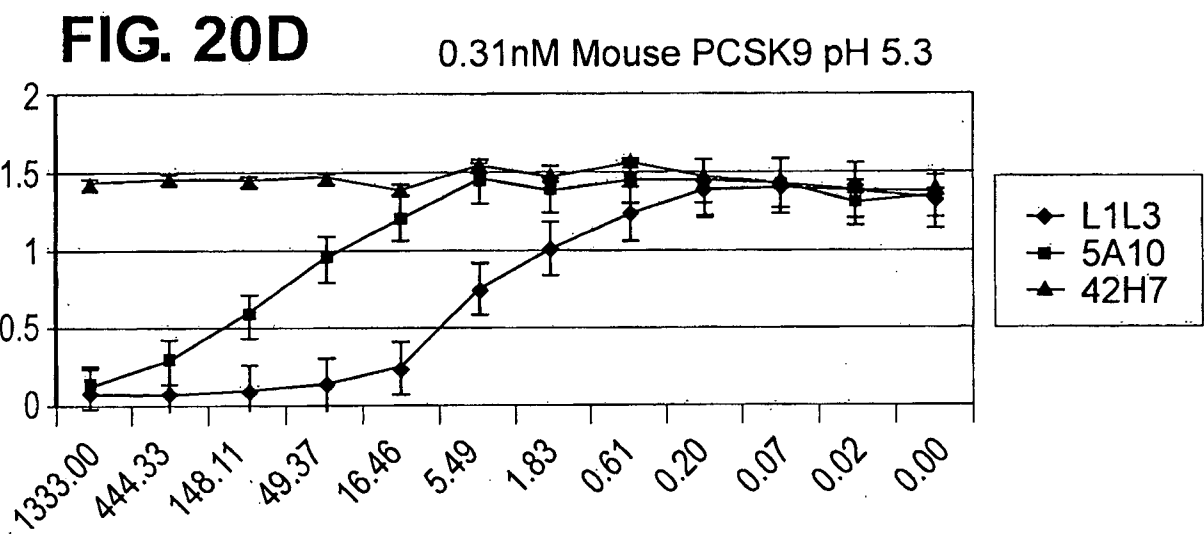


FIG. 19



16/26





18/26

FIG. 22

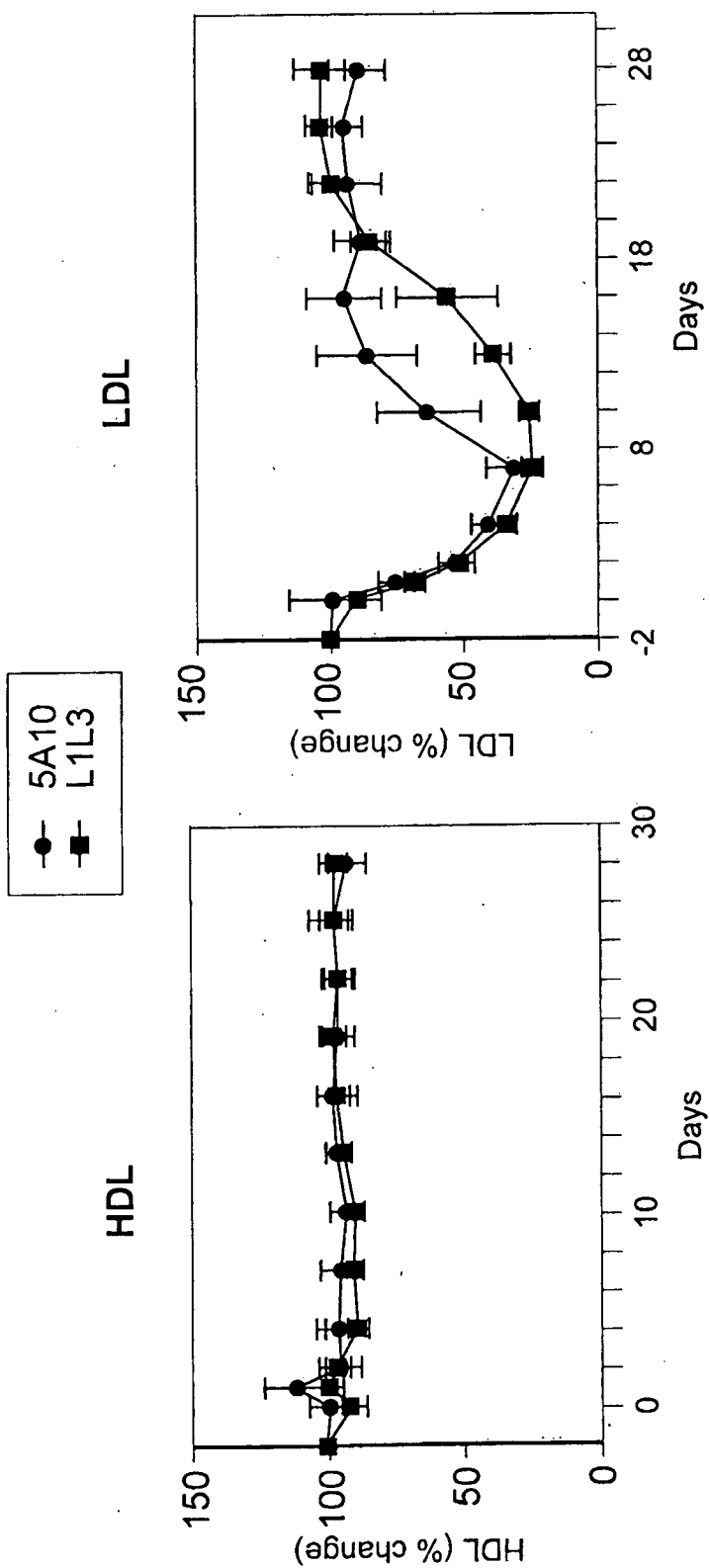


FIG. 23A

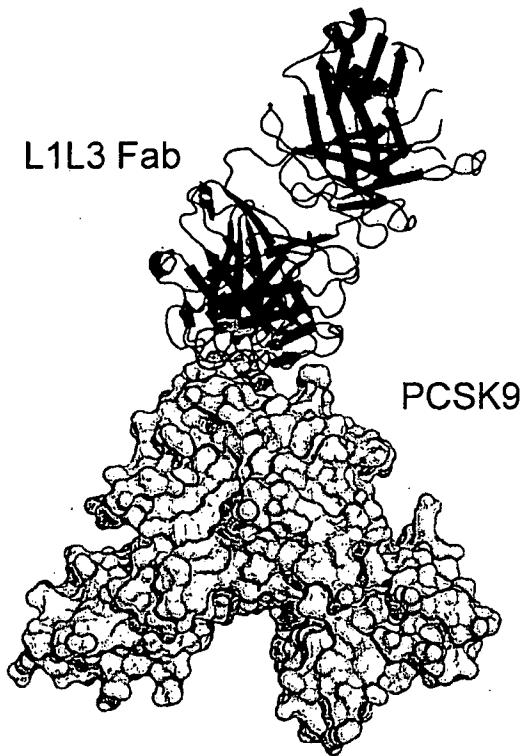


FIG. 23B

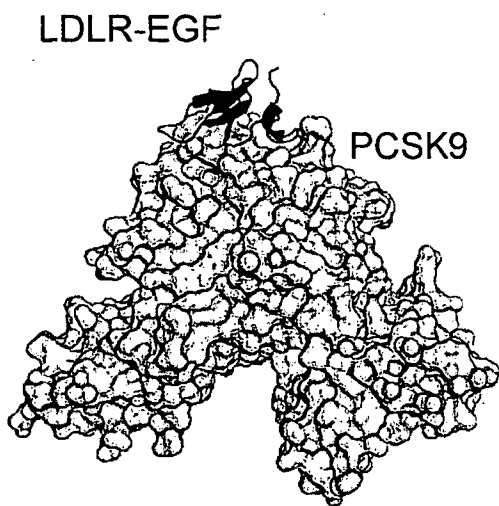


FIG. 23C

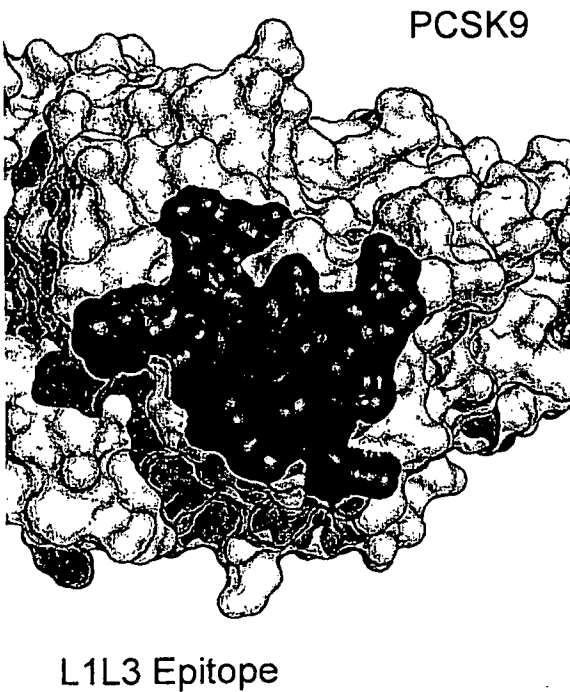
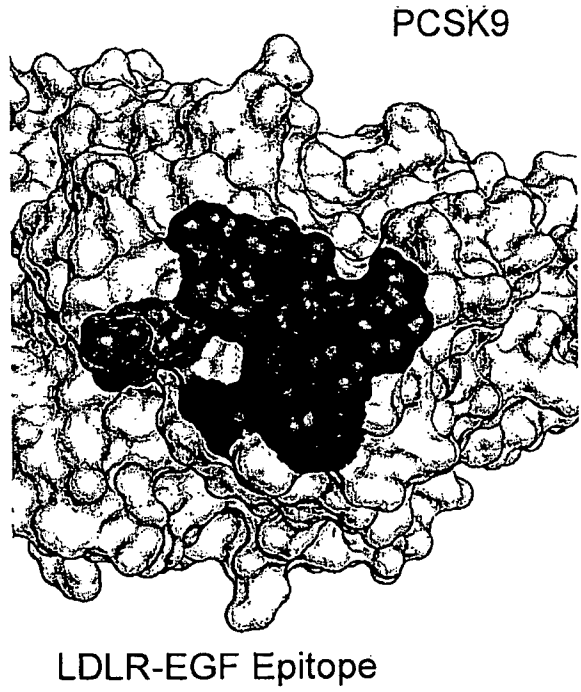


FIG. 23D



208

FIG. 24A

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{on} [1/s]	K _D [pM]
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 57	EINPSNGRRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 45		1100
QDVSTAVA 62							620000
GGTRWSTAVA 63							
RGDFVSTAVA 64							
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 45	9x10 ⁻⁴	
				EINPSGGRTNYNEKFKS 65		1x10 ⁻³	
				EINPSSGRTNYNEKFKS 66		1x10 ⁻³	
				EINPSTGRTNYNEKFKS 67		1x10 ⁻³	
				EINPSIGRTNYNEKFKS 68		8x10 ⁻⁴	
				EINPSDSRTNYNEKFKS 69		1x10 ⁻³	
				EINPSGNRTNYNEKFKS 70		1x10 ⁻³	
				EINPSSSRTNYNEKFKS 71		1x10 ⁻³	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 72	9x10 ⁻⁴	
					ERPLYAADY 73	9x10 ⁻⁴	
					ERPLYAIDY 74	3x10 ⁻³	
					ERPLYARDY 75	5x10 ⁻³	
					ERPLYAGDY 76	1x10 ⁻³	
					ERPLYAKDY 77	1x10 ⁻³	
					ERPLYAPDY 78	7x10 ⁻³	
					ERPLYASDY 79	8x10 ⁻³	
					ERPLYALDY 80	1x10 ⁻³	
					ERPLYAVDY 81	2x10 ⁻³	
					ERPLYAWDY 82	2x10 ⁻³	
					ERPLYAHDY 83	9x10 ⁻³	

FIG. 24B

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
					ERPLYAFDY 84	2x10 ⁻³	
					ERPLYATDY 85	1x10 ⁻³	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 ⁻⁴	
		QCRFSTPRT 86				2x10 ⁻⁴	
		QCRYSDWRT 87				5x10 ⁻⁴	
		QCRYSSWRT 88				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSTART 89				7x10 ⁻⁴	
		QCRYSLYRT 90				6x10 ⁻⁴	
		QCRYSLWRT 13				4x10 ⁻⁴	
		QCRYFWRT 91				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSPWRT 92				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSGWRT 93				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSIWRT 94				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSAWRT 95				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSLFRT 96				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSTRRT 97				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSTLYT 98				4x10 ⁻⁴	
		QCRYSTWRT 99				5x10 ⁻⁴	
		QCRYSLART 100				5x10 ⁻⁴	
		QCRYSSERT 101				5x10 ⁻⁴	
		QCRYGTART 102				5x10 ⁻⁴	
		QCRYQART 103				5x10 ⁻⁴	
		QCRYSLHRT 104				6x10 ⁻⁴	

2189

FIG. 24C

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
		QQRYSGVRT 105				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSQSRT 106				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSAERT 107				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSQFRT 108				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSSRRT 109				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSCSRT 110				3x10 ⁻⁴	
		QQRYSTNRR 111				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSRWRT 112				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSPYRT 113				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSYWRT 114				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSGFRT 115				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSYWRT 116				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSFKRT 117				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSARRT 118				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSBYRT 119				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSLQRT 120				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTSRT 121				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSHART 122				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSKYRT 123				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSQSRT 124				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTART 125				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTCCT 126				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTDRT 127				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSEDRT 128				7x10 ⁻⁴	

FIG. 24D

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{on} [1/s]	K _D [pM]
		QQRVVGRT 129				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSLSRT 130				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSLGRT 131				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSRART 132				8x10 ⁻⁴	
		QQRYSHART 133				8x10 ⁻⁴	
		QQRYSTPDT 134				9x10 ⁻⁴	
		QQRYYQQPRT 135				9x10 ⁻⁴	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 ⁻⁴	
				EIQVSGGRTNYNEKFKS 136		9x10 ⁻⁴	
				EINPWQGRRTNYNEKFKS 137		4x10 ⁻⁴	
				EINPVQGRRTNYNEKFKS 138		6x10 ⁻⁴	
				EISPFQGRRTNYNEKFKS 9		2x10 ⁻⁴	
				EISPYGGRTNYNEKFKS 139		3x10 ⁻⁴	
				EIQESGGRTNYNEKFKS 140		3x10 ⁻⁴	
				EISPIGGRTNYNEKFKS 141		4x10 ⁻⁴	
				EINPEHGRRTNYNEKFKS 142		4x10 ⁻⁴	
				EINPSEGRRTNYNEKFKS 143		4x10 ⁻⁴	
				EINPVMGRRTNYNEKFKS 144		5x10 ⁻⁴	
				EINPQGGRTNYNEKFKS 145		5x10 ⁻⁴	
				EINPVKGRRTNYNEKFKS 146		5x10 ⁻⁴	
				EIGPWGGRRTNYNEKFKS 147		5x10 ⁻⁴	
				EINPIGGRTNYNEKFKS 148		6x10 ⁻⁴	
				EIQISGGRTNYNEKFKS 149		7x10 ⁻⁴	

FIG. 24E

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
				EINPQGTRTNYNEKFS 150		8x10 ⁻⁴	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDS 151	2x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDR 152	2x10 ⁻⁴	
					ERPLYAMDR 153	2x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDA 154	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDV 155	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYAHDV 156	4x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDY 157	4x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDL 10	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDV 158	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDA 159	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDS 160	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYATDL 161	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDS 162	6x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDM 163	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYAHDL 164	4x10 ⁻⁴	
					ERPLYAHDl 165	6x10 ⁻⁴	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45		1470
					ERPLYANDV 166		342
					ERPLYASDY 167		755
					ERPLYASDL 10		343
					ERPLYASDR 168		271

FIG 24F

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
					ERPLYASDV 169		286
					ERPLYAHDV 170		385
					ERPLYANDM 171		413
					ERPLYAHDL 172		376
				EINPWQGRRTNYNEKFS 173			1390
				EINPVQGRRTNYNEKFS 174			439
				EISPYGGRRTNYNEKFS 175			216
				EISPFQGRRTNYNEKFS 9			239
				EIGPWGGRRTNYNEKFS 176			363
		QQRYSDWRT 177					616
		QQRYSSWRT 178					728
		QQRYSAERT 179					345
		QQRYSLHRT 180					228
		QQRYSLWRT 13					94
		QQRYSSERT 181					886
		QQRYSLQRT 182					497
		QQRYSTRRT 183					297
							KD at 37C
		QQRYSLWRT 13		EISPFQGRRTNYNEKFS 9			343
		QQRYSLWRT 13			ERPLYASDL 10		384
				EISPFQGRRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		253
		QQRYSLWRT 13		EISPFQGRRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		183
		QQRYSDWRT 184			ERPLYASDL 10		466

FIG. 24G

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
					ERPLYASDL 10		703
							KD at 37C
				EISPFGGRTNYNEKFKS 9	ERPLYASDL 10		155
		QQRYSLWRT 13		EISPFGGRTNYNEKFKS 9	ERPLYASDL 10		79
				EISPYGGRTNYNEKFKS 185	ERPLYASDL 10		215
		QQRYSRSRT 186			ERPLYASDL 10		621
					ERPLYASDL 10		968
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45		1470
RASQGISSALA 11							1660
	GASYLHS 186						9890
	DASN RAT 187						105000
RASQGISSALA 11	SASYRYT 12	QQRYSLWRT 13	GYTFTSYMH 59	EISPFGGRTNYNEKFKS 9	ERPLYASDL 10		7

72
96

pctib2009053990-seq1
SEQUENCE LISTING

<110> Rinat Neuroscience Corporation
Pfizer Inc.

<120> PCSK9 Antagonists

<130> PC33718A

<160> 187

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val
1 5 10 15

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe
1 5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Gly Ser Leu Val Glu
1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Pro Val Gly Pro Leu
1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

His Gly Ala Gly Trp
1 5

73

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Glu Pro Glu Leu
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VARIABLE HEAVY CHAIN CDR

<400> 8

Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VARIABLE HEAVY CHAIN CDR

<400> 9

Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe/Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VARIABLE HEAVY CHAIN CDR

<400> 10

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu
1 5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VARIABLE LIGHT CHAIN CDR

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VARIABLE LIGHT CHAIN CDR
<400> 12

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VARIABLE LIGHT CHAIN CDR
<400> 13

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr
1 5

<210> 14
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> HUMANIZED L1L3 LIGHT CHAIN
<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

pctib2009053990-seq1

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> HUMANIZED L1L3 HEAVY CHAIN

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

74
M

pctib2009053990-seq1

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Leu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

78
80

pctib2009053990-seq1

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Phe Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 20
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

81 79

pctib2009053990-seq1

Val Ser Ala
115

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 21

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

<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 22

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

80
82

100

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 23

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Val Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> LINKING PEPTIDE

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 25
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> HUMANIZED LIGHT CHAIN NUCLEOTIDE SEQUENCE

<400> 25
gatatacaaa tgacacaatc tccatcctct ctttccgcat cagtcggcga ccgcgtaacc 60
atcacatgta gagcttctca aggcattctc tccgccctcg catggtacca acaaaaacca 120
ggtaaagccc caaaactcct catatactca gttcataca gatacaccgg cgtaccctca 180
agattctcag gttcaggctc tggaacagac ttactttca ccatttcac actccaaccc 240

81
3

pctib2009053990-seq1
gaagacatag ctacatatta ctgccaacaa agatacagcc tctggagaac atttggccaa 300
ggaacaaaac tcgagatcaa acgtacggtg gctgcacccat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 26
<211> 1332
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> HUMANIZED HEAVY CHAIN NUCLEOTIDE SEQUENCE

<400> 26
caagttcaac tcgttcaatc tggagcagaa gtaaaaaaac ctggcgccctc tgttaaagta 60
agttgtaaag catccggtta cacattcaca tcatattaca tgcattgggt aagacaagcc 120
cctggacaag gactcgaatg gatgggtgaa atctctcctt ttggcggccg aacaaactat 180
aatgaaaaat ttaaattccg cgtaactatg acccgagaca catccacatc tactgtttat 240
atggaacttt cctcactgcg ttctgaagac actgctgttt attactgtgc acgcgaaaga 300
cctctctacg cttccgatct ctggggccaa ggaacaacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catctgtctt cccactggcc ccatgctccc gcagcacctc cgagagcaca 420
gccgccttg gctgcctggt caaggactac ttcccagaac ctgtgaccgt gtcctggaac 480
tctggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccagctg tcctgcagtc ctcaggtctc 540
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcca tccagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
tgcaacgtag atcacaagcc aagcaacacc aaggtagata agaccgtgga gagaaagtgt 660
tgtgtggagt gtccaccttg tccagccctt ccagtggccg gaccatccgt gttcctgttc 720
cctccaaagc caaaggacac cctgatgata tccagaacct cagaggtgac ctgtgtggtg 780
gtggacgtgt cccacgagga cccagaggtg cagttcaact ggtatgtgga cggagtggag 840
gtgcacaacg ccaagaccaa gccaaagagag gagcagttca actccacctt cagagtgggtg 900
agcgtgctga ccgtggtgca ccaggactgg ctgaacggaa aggagtataa gtgtaagggtg 960
tccaacaagg gactgccatc cagcatcgag aagaccatct ccaagaccaa gggacagcca 1020
agagagccac aggtgtatac cctgccccca tccagagagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
tcctgacct gtctggtgaa gggattctat ccatccgaca tcgccgtgga gtgggagtcc 1140
aacggacagc cagagaacaa ctataagacc acccctccaa tgctggactc cgacggatcc 1200
ttcttctgt attccaagct gaccgtggac aagtccagat ggcagcaggg aaacgtgttc 1260
tcttgttccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactata cccagaagag cctgtccctg 1320
tctccaggaa ag 1332

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27

84/82

pctib2009053990-seq1

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 28

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

Gln Gln Phe Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

83
65

pctib2009053990-seq1

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 35

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

Asn Pro Asn Asn Gly Gly
1 5

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

Trp Leu Leu Phe Ala Tyr
1 5

<210> 41
<211> 7

84
26

pctib2009053990-seq1

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 41

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

Asn Pro Ser Asn Gly Arg
1 5

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 44

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 45

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

85
87

pctib2009053990-seq1

<400> 47

Gly Gly Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49

Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 50

Asn Tyr Asp Gly Ser Asn
1 5

<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

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

86
16

pctib2009053990-seq1
45

35

40

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

<210> 54
<211> 118
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 54

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

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 55

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

87
4A

pctib2009053990-seq1

<220>
<223> Synthetic
<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 58

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 59

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 60

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 61

Ser Pro Phe Gly Gly Arg
1 5

88
20

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 62

Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 63

Gly Gly Thr Arg Val Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 64

Arg Gly Asp Phe Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 65

Glu Ile Asn Pro Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 66

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

89
d

pctib2009053990-seq1

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 67

Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 68

Glu Ile Asn Pro Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 69

Glu Ile Asn Pro Ser Asp Ser Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 70

Glu Ile Asn Pro Ser Gly Asn Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 71
<211> 17

90
92

pctib2009053990-seq1

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 71

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Ser Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 72

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 73

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ala Asp Tyr
1 5

<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 74

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 75

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Arg Asp Tyr
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

91
B

pctib2009053990-seq1

<220>
<223> Synthetic

<400> 76

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Gly Asp Tyr
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 77

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Lys Asp Tyr
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 78

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Pro Asp Tyr
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 79

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr
1 5

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 80

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 81

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Val Asp Tyr
1 5

92
94

pctib2009053990-seq1

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 82

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Trp Asp Tyr
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 83

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Tyr
1 5

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 84

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 85

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Thr Asp Tyr
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 86

Gln Gln Arg Phe Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

93
PS

pctib2009053990-seq1

<220>
<223> Synthetic

<400> 87

Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr
1 5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 88

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Trp Arg Thr
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 89

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ala Arg Thr
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 90

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Tyr Arg Thr
1 5

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 91

Gln Gln Arg Tyr Ser Phe Trp Arg Thr
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 92

Gln Gln Arg Tyr Ser Pro Trp Arg Thr
1 5

94
96

pctib2009053990-seq1

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 93

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Trp Arg Thr
1 5

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 94

Gln Gln Arg Tyr Ser Ile Trp Arg Thr
1 5

<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 95

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Trp Arg Thr
1 5

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 96

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Phe Arg Thr
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 97

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Arg Arg Thr
1 5

<210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

95
47

pctib2009053990-seq1

<220>
<223> Synthetic
<400> 98

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 99

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Trp Arg Thr
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 100

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Ala Arg Thr
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 101

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Glu Arg Thr
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 102

Gln Gln Arg Tyr Gly Thr Ala Arg Thr
1 5

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 103

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ala Arg Thr
1 5

96
98

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 104

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu His Arg Thr
1 5

<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 105

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Val Arg Thr
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 106

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ser Arg Thr
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 107

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Glu Arg Thr
1 5

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 108

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Phe Arg Thr
1 5

<210> 109
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 109

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Arg Arg Thr
1 5

<210> 110
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 110

Gln Gln Arg Tyr Ser Cys Ser Arg Thr
1 5

<210> 111
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 111

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Asn Arg Arg
1 5

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 112

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Trp Arg Thr
1 5

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 113

Gln Gln Arg Tyr Ser Pro Tyr Arg Thr
1 5

<210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<400> 114

Gln Gln Arg Tyr Ser Tyr Trp Arg Thr
1 5

98
100

pctib2009053990-seq1

<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 115

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Phe Arg Thr
1 5

<210> 116
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 116

Gln Gln Arg Tyr Ser Tyr Trp Arg Thr
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 117

Gln Gln Arg Tyr Ser Phe Lys Arg Thr
1 5

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 118

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Arg Arg Thr
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 119

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Tyr Arg Thr
1 5

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

99
101

pctib2009053990-seq1

<220>
<223> Synthetic

<400> 120

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gln Arg Thr
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 121

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ser Arg Thr
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 122

Gln Gln Arg Tyr Ser His Ala Arg Thr
1 5

<210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 123

Gln Gln Arg Tyr Ser Lys Tyr Arg Thr
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 124

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ser Arg Thr
1 5

<210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 125

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ala Phe Thr
1 5

100
102

<210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 126

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Cys Cys Thr
1 5

<210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 127

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Asp Arg Thr
1 5

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 128

Gln Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Arg Thr
1 5

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 129

Gln Gln Arg Tyr Val Gly Arg Thr
1 5

<210> 130
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 130

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Ser Arg Thr
1 5

<210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

101
103

pctib2009053990-seq1

<220>
<223> Synthetic

<400> 131

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gly Arg Thr
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 132

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Ala Arg Thr
1 5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 133

Gln Gln Arg Tyr Ser His Ala Arg Thr
1 5

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 134

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Asp Thr
1 5

<210> 135
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 135

Gln Gln Arg Tyr Gln Gln Pro Arg Thr
1 5

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 136

Glu Ile Gln Val Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

101

Ser

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 137

Glu Ile Asn Pro Trp Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 138
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 138

Glu Ile Asn Pro Val Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 139
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 139

Glu Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 140

Glu Ile Gln Glu Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

102
105

pctib2009053990-seq1

<210> 141
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 141

Glu Ile Ser Pro Ile Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 142
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 142

Glu Ile Asn Pro Glu His Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 143
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 143

Glu Ile Asn Pro Ser Glu Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 144

Glu Ile Asn Pro Trp Met Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 145
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

103
106

<220>
<223> Synthetic

<400> 145

Glu Ile Asn Pro Gln Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 146
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 146

Glu Ile Asn Pro Val Lys Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 147
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 147

Glu Ile Gly Pro Trp Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 148
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 148

Glu Ile Asn Pro Ile Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 149
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 149

104
102

pctib2009053990-seq1

Glu Ile Gln Ile Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 150
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 150

Glu Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 151

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ser
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 152

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Arg
1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 153

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Arg
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

105
108

pctib2009053990-seq1

<400> 154

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Ala
1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 155

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Val
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 156

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Val
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 157

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr
1 5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 158

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Val
1 5

<210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 159

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ala
1 5

<210> 160

106
109

pctib2009053990-seq1

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 160

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Ser
1 5

<210> 161
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 161

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Thr Asp Leu
1 5

<210> 162
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 162

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ser
1 5

<210> 163
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 163

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Met
1 5

<210> 164
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 164

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Leu
1 5

<210> 165
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

107
110

pctib2009053990-seq1

<400> 165

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Ile
1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 166

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Val
1 5

<210> 167

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 167

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr
1 5

<210> 168

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 168

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Arg
1 5

<210> 169

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 169

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Val
1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 170

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Val
1 5

<210> 171

108
1111

pctib2009053990-seq1

<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 171

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Met
1 5

<210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 172

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Leu
1 5

<210> 173
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 173

Glu Ile Asn Pro Trp Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 174
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 174

Glu Ile Asn Pro Val Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 175
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 175

Glu Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

109
112

Ser

<210> 176
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 176

Glu Ile Gly Pro Trp Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 177

Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr
1 5

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 178

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Trp Arg Thr
1 5

<210> 179
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 179

Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Glu Arg Thr
1 5

<210> 180
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 180

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu His Arg Thr
1 5

119
113

pctib2009053990-seq1

<210> 181
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 181

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Glu Arg Thr
1 5

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 182

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gln Arg Thr
1 5

<210> 183
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 183

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Arg Arg Thr
1 5

<210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 184

Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr
1 5

<210> 185
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 185

Glu Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 186
<211> 9

111
714
NME

pctib2009053990-seq1

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 186

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Ser Arg Thr
1 5

<210> 187
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 187

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

115

ANTAGONISTAS DE PCSK9

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos
5 de longitud completa o porciones de unión a antígeno de los mismos, péptidos
y aptámeros que antagonizan la actividad de la proproteína convertasa
subtilisina kexina de tipo 9 (PCSK9) extracelular, incluyendo su interacción con
el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) (LDLR). Más
específicamente, la invención se refiere a composiciones que comprenden
10 anticuerpos, péptidos y/o aptámeros antagonistas de PCSK9 y a
procedimientos para usar estos anticuerpos y/o péptidos y/o aptámeros como
un medicamento. Los anticuerpos, péptidos y aptámeros antagonistas de
PCSK9 se pueden usar terapéuticamente para disminuir los niveles de
colesterol LDL en sangre y se pueden usar en la prevención y/o el tratamiento
15 de trastornos del metabolismo de colesterol y lipoproteínas, que incluyen
hipercolesterolemia familiar, dislipidemia aterógena, aterosclerosis y, de forma
más general, enfermedad cardiovascular (CVD).

Antecedentes la Invención

20 Millones de personas en los Estados Unidos presentan riesgo de
cardiopatía y acontecimientos cardíacos resultantes. La CVD y la
ateroesclerosis subyacente son la causa principal de muerte entre todos los
grupos demográficos, a pesar de la disponibilidad de terapias dirigidas a sus
múltiples factores de riesgo. La aterosclerosis es una enfermedad de las
25 arterias y es responsable de cardiopatía coronaria asociada con muchas

muertes en países industrializados. Ahora se han identificado varios factores de riesgo para cardiopatía coronaria: dislipidemias, hipertensión, diabetes, tabaquismo, mala alimentación, inactividad y estrés. Las dislipidemias más clínicamente pertinentes y comunes se caracterizan por un aumento en beta-lipoproteínas (lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y LDL) con hipercolesterolemia en ausencia o presencia de hipertrigliceridemia (Fredrickson y col., 1967, N Engl J Med. 276: 34-42, 94-103, 148-156, 215-225 y 273-281). Existe una necesidad no satisfecha significativa desde hace tiempo con respecto a CVD, teniendo lugar el 60-70% de acontecimientos cardiovasculares, infartos de miocardio y apoplejías a pesar del tratamiento con estatinas (el patrón actual de cuidados en aterosclerosis). Además, nuevas directrices sugieren que se deben conseguir niveles de LDL incluso menores para proteger pacientes con alto riesgo contra CVD prematura [National Cholesterol Education Program (NCEP), 2004].

La PCSK9, también conocida como NARC-1, se identificó como una proteína con una mutación genética en algunas formas de hipercolesterolemia familiar. La PCSK9 se sintetiza como un cimógeno que se somete a procesamiento autocatalítico en el motivo LVFAQ en el retículo endoplásmico. Los estudios con población han demostrado que algunas mutaciones de PCSK9 son de "ganancia de función" y se observan en individuos con hipercolesterolemia autosómica dominante, mientras que otras mutaciones de "pérdida de función" (LOF) están vinculadas con colesterol plasmático reducido. Los estudios de morbilidad y mortalidad en este grupo demostraron claramente que la reducción de la función de PCSK9 disminuyó significativamente el riesgo de enfermedad cardiovascular.

De importancia significativa para el tratamiento de CVD, una mutación de LOF puede sensibilizar a los seres humanos frente a estatinas, permitiendo eficacia a una menor dosis (por tanto, mejorando los riesgos asociados con seguridad y tolerancia) y consiguiendo potencialmente niveles menores de colesterol plasmático que con terapias actuales.

La PCSK9 se secreta al plasma predominantemente por los hepatocitos. La modulación genética de PCSK9 en ratones confirmó la capacidad de PCSK9 de regular lípidos sanguíneos y sugirió que actúa regulando negativamente los niveles proteicos de LDLR hepáticos.

El mecanismo por el cual y el sitio en el cual la PCSK9 regula por disminución la proteína LDLR no se han establecido claramente. Cuando se sobreexpresa, la PCSK9 puede actuar tanto dentro del hepatocito como como un ligando secretado para LDLR. Existen indicios fuertes de que la PCSK9 extracelular se une a LDLR de superficie celular y promueve la degradación de LDLR en un sitio intracelular. Sin embargo, también es posible que la PCSK9 pudiera interaccionar con el LDLR cuando las dos proteínas se traducen dentro del retículo endoplásmico (RE) y transitan a través de compartimentos endosómicos hacia la membrana celular. Maxwell y col., 2005, Curr. Opin. Lipidol. 16: 167-172, mostraron que la endocitosis de LDLR mediada por PCSK9 y la degradación no estaban alteradas por inhibidores de proteosoma ni se modulaban por diferentes clases de proteasas lisosómicas y no lisosómicas. Se ha descrito que dos mutaciones de hipercolesterolemia familiar de origen natural, S127R y D129G, son defectuosas en autoprosesamiento y secreción cuando los niveles de estas proteínas mutantes se redujeron en gran medida o eran indetectables en los medios de células transfectadas. Aunque estos

mutantes demostraron una capacidad aumentada de regular negativamente LDLR, de forma coherente con su identificación en individuos con alto nivel plasmático de LDL (Homer y col., 2008, *Atherosclerosis* 196: 659-666; Cameron y col., 2006 *Human Molecular Genetics* 15: 1551-1558; Lambert y col., 2006, *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 17: 79-81). Ya que estos mutantes aparentemente no se secretan extracelularmente y todavía regulan negativamente LDLR, esto sugiere claramente que un sitio de acción intracelular es fisiológicamente importante.

A partir de la información disponible en la técnica, y antes de la presente invención, seguía estando poco claro si la introducción de un antagonista de PCSK9 basado en anticuerpo, péptido o aptámero en el torrente sanguíneo para antagonizar selectivamente PCSK9 extracelular sería eficaz para reducir hipercolesterolemia y la incidencia asociada de CVD y, si esto fuera así, qué propiedades de un antagonista de PCSK9 se necesitarían para tal eficacia *in vivo*.

Sumario de la Invención

Esta invención se refiere a anticuerpos, péptidos y aptámeros antagonistas que interaccionan selectivamente e inhiben la función de PCSK9. Se demostró por primera vez que ciertos antagonistas de PCSK9 son eficaces *in vivo* para disminuir el colesterol sanguíneo.

En una realización, la invención proporciona un antagonista aislado de PCSK9 que comprende un anticuerpo, un péptido o un aptámero, que interacciona con PCSK9 y que, cuando se administra a un sujeto, disminuye el nivel de colesterol LDL en la sangre de dicho sujeto. El antagonista puede ser

114
MA

un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-PCSK9 aislado que se une específicamente a PCSK9 y que es un antagonista
5 completo del efecto mediado por PCSK9 sobre los niveles de LDLR cuando se mide *in vitro* usando el ensayo de regulación por disminución de LDLR en células Huh7 descrito este documento.

En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo aislado que antagoniza la interacción extracelular de PCSK9 con el LDLR, medida por
10 la unión de PCSK9 al LDRL *in vitro* y, cuando se administra a un sujeto, disminuye el nivel de colesterol LDL en la sangre de dicho sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo reconoce un epítipo sobre PCSK9 humano que se solapa con más de aproximadamente el 75% de la superficie de PCSK9 que interacciona con el dominio similar a EGF del LDRL como se describe en Kwon
15 y col., 2008, PNAS, 105: 1820-1825.

En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo que reconoce un primer epítipo de PCSK9 que se solapa con un segundo epítipo que es reconocido por un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo
20 constituido por 5A10, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8986; 4A5, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8985; 6F6, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de
25 Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8984 y 7D4,

que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8983.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo para PCSK9 humano, reconociendo el anticuerpo un epítipo en PCSK9 humano que comprende los restos de aminoácidos 153-155, 194, 195, 197, 237-239, 367, 369, 374-379 y 381 de la secuencia de aminoácidos de PCSK9 de la SEC ID N°: 53. Preferiblemente, el epítipo de anticuerpo en PCSK9 humano no comprende uno o más de los restos de aminoácidos 71, 72, 150-152, 187-192, 198-202, 212, 214-217, 220-226, 243, 255-258, 317, 318, 347-351, 372, 373, 380, 382 y 383.

En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a PCSK9 que comprende una región determinante de complementariedad uno (CDR1) de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 8 (SYVMH), una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 9 (EISPFGGRTNYNEKFKS) y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 10 (ERPLYASDL) o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3, donde la variante conserva esencialmente la misma especificidad de unión que la CDR definida por dichas secuencias. Preferiblemente, la variante comprende hasta aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y, más preferiblemente, hasta aproximadamente cuatro sustituciones de aminoácidos.

La invención se refiere adicionalmente a un anticuerpo que comprende

una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11 (RASQGISSALA), una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 12 (SASYRYT) y/o una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13 (QQRYS LWRT) o
5 una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3, donde la variante conserva esencialmente la misma especificidad de unión que la CDR1 definida por dichas secuencias. Preferiblemente, la variante comprende hasta aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y, más preferiblemente,
10 hasta aproximadamente cuatro sustituciones de aminoácidos.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VL específicas o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3 y que comprende además una región
15 determinante de complementariedad CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 59, 60 u 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 61 ó 9 y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 10 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos
20 conservativas en dichas secuencias de CDR1, CDR2 y/o CDR3, donde la variante conserva esencialmente la misma especificidad de unión que la CDR1, CDR2 y/o CDR3 definida por dichas secuencias. Preferiblemente, la variante comprende hasta aproximadamente veinte sustituciones de aminoácidos y, más preferiblemente, hasta aproximadamente ocho sustituciones de
25 aminoácidos. En otra realización preferida, el anticuerpo de la invención tiene

una secuencia de cadena pesada variable que contiene o que está constituida por la SEC ID N°: 54 y una secuencia de cadena ligera variable que comprende o que está constituida por la SEC ID N°: 53.

La invención también proporciona un anticuerpo humanizado que
5 comprende polipéptidos seleccionados entre los grupos constituidos por la SEC ID N°: 14, la SEC ID N°: 15 o tanto la SEC ID N°: 14 como la SEC ID N°: 15 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias, donde la variante conserva esencialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo definido por dicha o dichas
10 secuencias. También incluye un anticuerpo que carece de una lisina terminal en la cadena pesada, ya que la misma se pierde de forma normal en una proporción de anticuerpos durante la fabricación.

Preferiblemente, la variante comprende hasta aproximadamente veinte sustituciones de aminoácidos y, más preferiblemente hasta aproximadamente
15 ocho sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo comprende además una región constante inmunológicamente inerte y/o el anticuerpo tiene un isotipo que se selecciona entre el grupo constituido por IgG₂, IgG₄, IgG_{2Δa}, IgG_{4Δa}, IgG_{4Δb}, IgG₄ S228P, IgG_{4Δb} S228P e IgG_{4Δc} S229P. En otra realización preferida, la región constante es Fc aglucosilado.

20 En una realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir un nivel de LDL, colesterol LDL o colesterol total en sangre, suero o plasma de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la invención.

En una realización, la invención proporciona una cantidad
25 terapéuticamente eficaz de un antagonista de la invención para el uso en la

116
119

reducción de un nivel de LDL, colesterol LDL o colesterol total en sangre, suero o plasma de un sujeto que lo necesita. La invención proporciona además el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la invención en la fabricación de un medicamento para reducir un nivel de LDL, colesterol LDL
5 o colesterol total en sangre, suero o plasma de un sujeto que lo necesita.

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento para preparar un anticuerpo que se une específicamente a PCSK9, que comprende:
a) proporcionar un animal huésped negativo a PCSK9; b) inmunizar dicho animal huésped negativo a PCSK9 con PCSK9; y c) obtener un anticuerpo, una
10 célula productora de anticuerpos o un ácido nucleico que codifica anticuerpo de dicho animal huésped negativo a PCSK9 y preparar un anticuerpo de dicha célula productora de anticuerpos o dicho ácido nucleico que codifica anticuerpo.

La invención también comprende un procedimiento para reducir el nivel
15 de LDL en la sangre de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo preparado de acuerdo con la invención. El sujeto se puede tratar adicionalmente administrando una estatina. En una realización preferida, el sujeto es un sujeto humano.

20 En una realización, el anticuerpo se administra en una formulación como una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y que comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de tampón histidina, de aproximadamente 0,01
25 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, de aproximadamente

100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de trehalosa y de aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidrato.

En otra realización, la invención proporciona una cantidad
5 terapéuticamente eficaz del anticuerpo preparado de acuerdo con la invención para el uso en la reducción del nivel de LDL en la sangre de un sujeto que lo necesita. La invención proporciona además el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo preparado de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para reducir el nivel de LDL en la sangre
10 de un sujeto que lo necesita. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede combinar opcionalmente con una cantidad terapéuticamente eficaz de una estatina.

En otra realización, la invención proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo específico de PCSK9 o una porción de
15 unión a antígeno del mismo, seleccionándose la línea celular de hibridoma entre el grupo constituido por:

- 4A5 que tiene un N° de Acceso de ATCC PTA-8985;
- 5A10 que tiene un N° de Acceso de ATCC PTA-8986;
- 6F6 que tiene un N° de Acceso de ATCC PTA-8984; y
- 20 7D4 que tiene un N° de Acceso de ATCC PTA-8983.

En otra realización, la invención proporciona una línea celular que produce de manera recombinante un anticuerpo que se une específicamente a PCSK9 y que comprende una región determinante de complementariedad uno (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de
25 aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 8, 59 ó 60, una CDR2 de VH que tiene

117
120

la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 9 ó 61 y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 10 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3 y/o comprende una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 12 y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3. Preferiblemente, la línea celular produce de manera recombinante un anticuerpo que comprende la SEC ID N°: 53 y/o 54 y, más preferiblemente, la SEC ID N°: 14 y/o 15.

Breve Descripción de las Figuras/Dibujos

La Figura 1 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales antagonistas anti-PCSK9 7D4.4, 4A5.G3, 6F6.G10.3 y 5A10.B8 sobre la capacidad de PCSK9 de ratón (A) y PCSK9 humano (B) para regular por disminución LDLR en células Huh7 cultivadas. 6FG.10.3 es un subclón de 6F6, 7D4.4 es un subclón de 7D4, 4A5.G3 es un subclón de 4A5 y 5A10.B8 es un subclón de 5A10.

La Figura 2 ilustra la dosis-respuesta de anticuerpos monoclonales antagonistas anti-PCSK9 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3, 5A10.B8, anticuerpo de control negativo 42H7 y PBS para bloquear la unión de PCSK9 humano (A) y PCSK9 de ratón (B) biotinilado recombinante a dominio extracelular de LDLR recombinante inmovilizado *in vitro*.

La Figura 3 ilustra la dosis-respuesta de los anticuerpos monoclonales antagonistas anti-PCSK9 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3 y 5A10.B para bloquear la unión de PCSK9 humano biotinilado recombinante (30 nM) a dominio extracelular de LDLR recombinante marcado con Europio (10 nM) en solución a pH neutro *in vitro*.

La Figura 4 ilustra la unión a epítipo comparativa de anticuerpos anti-PCSK9.

La Figura 5 ilustra transferencias de Western de la unión de anticuerpos anti-PCSK9 a PCSK9 sérico de diferentes especies.

La Figura 6 ilustra el efecto de anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 7D4 sobre niveles de colesterol en sangre de ratones.

La Figura 7 ilustra (A) el efecto de un mAb anti-PCSK9 policlonal antagonista parcial CRN6 sobre la regulación por disminución de LDLR y (B) la ausencia de efecto sobre los niveles de colesterol en ratones.

La Figura 8 ilustra el desarrollo en el tiempo del efecto de disminución de colesterol obtenido mediante el uso de un anticuerpo antagonista anti-PCSK9 7D4 en ratones.

La Figura 9 ilustra la dependencia de dosis del mAb antagonista anti-PCSK9 7D4 sobre la reducción de colesterol total en suero, HDL y LDL en ratones.

La Figura 10 ilustra la dependencia de dosis del efecto de disminución de colesterol del anticuerpo antagonista anti-PCSK9 5A10 en ratones.

La Figura 11 ilustra la dependencia de dosis del efecto de disminución de colesterol de los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 (A) 4A5 y (B) 6F6 en ratones.

118
121

La Figura 12 ilustra transferencias de Western de anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 sobre los niveles de LDLR en hígado.

La Figura 13 ilustra la ausencia del efecto del anticuerpo antagonista anti-PCSK9 4A5 en un modelo de ratón LDLR^{-/-}.

- 5 La Figura 14 ilustra el efecto sobre colesterol sérico total de múltiples administraciones de anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 en ratones a lo largo de un curso en el tiempo más prolongado que el observado con una dosis única.

- 10 La Figura 15 ilustra el desarrollo en el tiempo de los efectos del anticuerpo antagonista anti-PCSK9 7D4 sobre parámetros lipídicos en un modelo de mono cynomolgus.

La Figura 16 ilustra la dosis- y tiempo-respuesta del anticuerpo antagonista anti-PCSK9 7D4 sobre niveles de colesterol en suero en el mono cynomolgus.

- 15 La Figura 17 ilustra una comparación de los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 sobre los niveles de colesterol en suero en el mono cynomolgus.

- 20 La Figura 18 ilustra el desarrollo en el tiempo del efecto del anticuerpo antagonista anti-PCSK9 7D4 sobre los niveles de colesterol en plasma de monos cynomolgus alimentados con una dieta del 33,4% de kcal de grasa complementada con colesterol al 0,1%.

La Figura 19 ilustra el efecto de L1L3 (anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 humanizado) sobre la regulación por disminución de LDLR en células Huh7.

- 25 La Figura 20 ilustra la dosis-respuesta del anticuerpo humanizado L1L3,

el precursor de ratón 5A10 y el anticuerpo de control negativo 42H7 sobre el bloqueo de la unión de PCSK9 humano (A y B) y PCSK9 de ratón (C y D) biotinilado recombinante al dominio extracelular de LDLR recombinante inmovilizado *in vitro* a pH 7,5 (A y C) y pH 5,3 (B y D).

5 La Figura 21 ilustra el efecto sobre el colesterol en suero del tratamiento de ratones con 10 mg/kg de L1L3.

La Figura 22 ilustra el efecto de la administración de anticuerpo 5A10 o L1L3 a monos cynomolgus y la medición de cambios en HDL en suero (A) y LDL en suero (B) como una función del tiempo.

10 La Figura 23A ilustra la estructura cristalina del PCSK9 (representación de superficie gris clara) unida al anticuerpo L1L3 (representación de dibujo negro). La Figura 23B ilustra la estructura cristalina del PCSK9 (representación de superficie gris clara) unida al dominio similar a EGF del LDLR (representación de dibujo oscuro) (Kwon y col., PNAS, 105, 1820-1825, 2008).

15 La Figura 23C muestra la representación de área superficial de PCSK9 con el epítipo de L1L3 mostrado en gris oscuro. La Figura 23D muestra la representación de área superficial de PCSK9 con el epítipo de dominio similar a EGF de LDLR mostrado en gris oscuro.

Las Figuras 24 A-G ilustran las sustituciones realizadas en las CDR del anticuerpo 5A10 en el curso de la maduración por afinidad y optimización y para conseguir propiedades particulares. También se representa la unión a PCSK9 asociado con anticuerpos que tienen estas sustituciones de CDR. El número después de cada secuencia en la SEC ID N° indica cada secuencia.

25 Descripción Detallada de la Invención

119
122

La presente invención se refiere a anticuerpos, péptidos y aptámeros que antagonizan la función de PCSK9 extracelular incluyendo su interacción con el LDLR. Más específicamente, la invención se refiere a procedimientos para preparar anticuerpos, péptidos y aptámeros antagonistas de PCSK9, composiciones que comprenden estos anticuerpos, péptidos y/o aptámeros y procedimientos para usar estos anticuerpos, péptidos y/o aptámeros como un medicamento. Los anticuerpos y péptidos antagonistas de PCSK9 se pueden usar para disminuir los niveles sanguíneos de colesterol LDL y se pueden usar en la prevención y/o el tratamiento de trastornos del metabolismo de colesterol y lipoproteínas, que incluyen hipercolesterolemia familiar, dislipidemia aterógena, aterosclerosis y, de forma más general, CVD.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait., ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. G. Griffiths y D. G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in

Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain
 5 Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean,
 10 eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

15 Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc. mediante al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en este documento, el término incluye no solamente anticuerpos
 20 policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena única (ScFv) y de dominio) y proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un
 25 anticuerpo de cualquier clase, tales como IgG, IgA o IgM (o sub-clase de los

1/20
123

mismos) y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de las mismas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Como se usa en este documento, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpo policlonal, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificante "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se tiene que considerar que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez

por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495 o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de fagos generados usando las técnicas descritas
5 en McCafferty y col., 1990, Nature 348: 552-554, por ejemplo.

Como se usa en este documento, anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a
10 antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima obtenida de inmunoglobulina no humana. Preferiblemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que se sustituyen los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo
15 donador) tales como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR
20 importada o las secuencias marco conservadas, pero se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos un, y típicamente dos dominios variables, en los que toda o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y
25 todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia

121
24

- consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o dominio (Fc), típicamente el de una inmunoglobulina humana. Se prefieren anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 y/o CDR H3) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "obtenidas de" una o más CDR del anticuerpo original.
- 10 Como se usa en este documento, "anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que se corresponde a la de un anticuerpo que se puede producir por un ser humano y/o que se ha preparado mediante el uso de cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidos por los especialistas en la técnica o descritos en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, Nature Biotechnology, 14: 309-314; Sheets y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95: 6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381; Marks y col., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581). Los anticuerpos humanos también
- 15
- 20
- 25

se pueden preparar por inmunización de animales en los que se han introducido de forma transgénica loci de inmunoglobulina humana en lugar de los loci endógenos, por ejemplo, ratones en los que se han inactivado parcialmente o completamente los genes de inmunoglobulina endógenos. Esta
5 estrategia se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016. Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B se podrán recuperar de un individuo o se pueden haber inmunizado *in vitro*).
10 Véase, por ejemplo, Cole y col. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77, 1985; Boerner y col., 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95 y la Patente de Estados Unidos N° 5.750.373.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera de anticuerpo o la región variable de la cadena pesada de
15 anticuerpo, sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera están constituidas cada una por cuatro regiones marco conservadas (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contienen regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se sujetan entre sí en proximidad cercana por las FR y, con las
20 CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) una estrategia basada en variabilidad de secuencia inter-especie (es decir, Kabat y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) una estrategia basada en estudios
25 cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y col., 1997, J.

1/22
12/25

Molec. Biol. 273: 927-948). Como se usa en este documento, una CDR se puede referir a CDR definidas por cada estrategia o por una combinación de ambas estrategias.

5 Como se conoce en la técnica, una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera de anticuerpo o la región constante de la cadena pesada de anticuerpo, sola o en combinación.

10 Como se usa en este documento, el término "PCSK9" se refiere a cualquier forma de PCSK9 y variantes del mismo que conservan al menos parte de la actividad de PCSK9. A menos que se indique de forma diferente, tal como por referencia específica a PCSK9 humano, PCSK9 incluye todas las especies de mamíferos con la secuencia nativa de PCSK9, por ejemplo, humano, canino, felino, equino y bovino. Un PCSK9 humano ilustrativo se encuentra con el Número de Acceso de Uniprot Q8NBP7 (SEC ID N°: 16).

15 Como se usa en este documento, un "antagonista de PCSK9" se refiere a un anticuerpo, péptido o aptámero que es capaz de inhibir la actividad biológica de PCSK9 y/o ruta o rutas cadena abajo mediadas por la señalización de PCSK9, que incluyen regulación por disminución mediada por PCSK9 del LDLR y disminución mediada por PCSK9 en el aclaramiento de sangre de LDL. Un anticuerpo antagonista de PCSK9 incluye anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (hasta cualquier grado incluyendo significativamente) la actividad biológica de PCSK9, incluyendo rutas cadena abajo mediadas por la señalización de PCSK9, tales como interacción de LDLR y/o provocación de una respuesta celular a PCSK9. Para el propósito de la presente invención, se entenderá explícitamente que la expresión "anticuerpo antagonista de PCSK9" incluye todos los términos, títulos y estados funcionales

20

25

y características que se han identificado previamente por los que el propio PCSK9, una actividad biológica de PCSK9 (que incluye, pero sin limitación, su capacidad de mediar cualquier aspecto de interacción con el LDLR, regulación por disminución de LDLR y aclaramiento de LDLR de sangre disminuido) o las
5 consecuencias de la actividad biológica, están sustancialmente anulados, disminuidos o neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista de PCSK9 se une a PCSK9 y evita la interacción con el LDLR. En este documento se proporcionan ejemplos de anticuerpos antagonistas de PCSK9.

10 Como se usa en este documento, un “antagonista completo” es un antagonista que, a una concentración eficaz, bloquea especialmente de forma completa un efecto medible de PCSK9. Con un antagonista parcial se quiere decir un antagonista que es capaz de bloquear parcialmente un efecto medible pero que, incluso a la máxima concentración, no es un antagonista completo.
15 Con esencialmente de forma completa se quiere decir que al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 98% o el 99% del efecto medible está bloqueado. Los “efectos medibles” pertinentes se describen en
20 este documento e incluyen regulación por disminución de LDLR por un antagonista de PCSK9 como se ensaya en células Huh7 *in vitro*, disminución *in vivo* en niveles sanguíneos (o plasmáticos) de colesterol total y disminución *in vivo* en niveles de LDL en sangre (o plasma).

Como se usa en este documento, la expresión “clínicamente
25 significativo” significa al menos una reducción del 15% en los niveles de

colesterol LDL en sangre en seres humanos o al menos una reducción del 15% en colesterol en sangre total en ratones. Está claro que las mediciones en plasma o suero pueden servir como sustitutos para medición de niveles en sangre.

- 5 Como se usa en este documento, la expresión "péptido antagonista de PCSK9" o "aptámero antagonista de PCSK9" incluye cualquier péptido o polipéptido o aptámero convencional que bloquea, antagoniza, suprime o reduce (hasta cualquier grado incluyendo significativamente) la actividad biológica de PCSK9, incluyendo rutas cadena abajo mediadas por señalización
- 10 de PCSK9, tales como interacción de LDLR y/o provocación de una respuesta celular a PCSK9. Los péptidos o polipéptidos antagonistas de PCSK9 incluyen fusiones Fc que comprenden el LDLR y porciones soluciones del LDLR o mutantes del mismo con mayor afinidad por PCSK9.

- Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan
- 15 de forma intercambiable en este documento para referirse a cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, preferiblemente, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o estar ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también incluyen una cadena de aminoácidos que
- 20 se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluye,
- 25 por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.) así como otras modificaciones

conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden tener lugar como cadenas únicas o cadenas asociadas.

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa de forma intercambiable en este documento, se refiere a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases; y/o sus análogos o cualquier sustrato que se pueda incorporar en una cadena por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura de nucleótidos se puede aplicar antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "caperuzas", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los

124
127

polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presente de forma normal en los azúcares se puede sustituir, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, proteger por grupos protectores convencionales o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales o se pueden conjugar con soportes sólidos. El OH terminal 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupo de protección terminal orgánico de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también se pueden derivatizar hasta grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares alfa- o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósido abásico tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S("tioato"), P(S)S("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), donde cada R o R' es independientemente H o alquilo (Con 1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en este documento, incluyendo ARN y ADN.

Un "aptámero antagonista de PCSK9", que comprende una secuencia de

ácido nucleico o de proteína, se selecciona, por ejemplo, entre una gran combinación de secuencias aleatorias y se une específicamente a PCSK9. El ácido nucleico del aptámero es ADN de doble hélice o ARN de hélice única. Los aptámeros de ácido nucleico pueden incluir bases modificadas o grupos
5 funcionales, que incluyen, pero sin limitación, nucleótidos 2'-fluoro y nucleótidos 2'-O-metilo. Los aptámeros pueden incluir polímeros hidrófilos, por ejemplo, polietilenglicol. Los aptámeros se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica y seleccionar para actividad antagonista de PCSK9 por modificación rutinaria de los procedimientos descritos en los Ejemplos.

10 Como se usa en este documento, un anticuerpo, péptido o aptámero "interacciona con" PCSK9 cuando la constante de disociación en equilibrio es igual a o menor de 20 nM, preferiblemente menor de aproximadamente 6 nM, más preferiblemente menor de aproximadamente 1 nM, mucho más preferiblemente menor de aproximadamente 0,2 nM, cuando se mide por los
15 procedimientos descritos en este documento en el Ejemplo 2.

Un epítopo que se "une preferentemente" o se "une específicamente" (usado de forma intercambiable en este documento) a un anticuerpo o un polipéptido es una expresión que se entiende bien en la técnica y también se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar tal unión específica
20 o preferente. Se dice que una molécula muestra "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular de lo que lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con
25 mayor afinidad, avidez, más rápidamente y/o con mayor duración de lo que se

une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente a un epítipo de PCSK9 es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, aidez, más rápidamente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítipos de PCSK9 o epítipos que no son de PCSK9.

- 5 Se entiende también al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente o preferentemente a una primera diana puede o puede que no se una específicamente o preferentemente a una segunda diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Generalmente, pero
- 10 no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferente.

- Como se usa este documento, "sustancialmente puro" se refiere a material que es al menos el 50% puro (es decir, libre de contaminantes), más preferiblemente, al menos el 90% puro, más preferiblemente, al menos el 95% puro, aún más preferiblemente, al menos el 98% puro y mucho más
- 15 preferiblemente, al menos el 99% puro.

- Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor para vector o vectores para la incorporación de insertos polinucleotídicos. Las células huésped incluyen progenie de una única célula huésped y la progenie puede no necesariamente ser completamente
- 20 idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula precursora original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido o polinucleótidos de esta invención.

- Como se conoce en la técnica, la expresión "región Fc" se usa para
- 25 definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La

“región Fc” puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para extenderse de un resto de aminoácido en la
 5 posición Cys226 o de Pro230 al extremo carboxilo del mismo. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, CH2 y
 10 CH3.

Como se usa en la técnica, “receptor Fc” y “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa de FcR humano. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases
 15 FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. Los FcR están recapitulados en
 20 Ravetch y Kinet, 1991, Ann. Rev. Immunol., 9: 457-92; Capel y col., 1994, Immunomethods, 4: 25-34; y de Haas y col., 1995, J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41. “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternal al feto (Guyer y col., 1976 J. Immunol., 117: 587; y Kim y col., 1994, J. Immunol., 24: 249).

25 El término “compite” como se usa en este documento con respecto a un

anticuerpo significa que un primer anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo de un modo suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de tal forma que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítopo afín disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, cuando la unión del segundo anticuerpo a su epítopo también ha disminuido de forma detectable en presencia del primer anticuerpo puede, pero no tiene porqué ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítopo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítopo afín o ligando, en el mismo, mayor o menor alcance, se dice que los anticuerpos tienen "competencia cruzada" entre sí para la unión de su respectivo epítopo o epítopos. Los anticuerpos tanto de competencia como de competencia cruzada están incluidos en la presente invención. Sin tener en cuenta el mecanismo por el que tiene lugar tal competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítopo común o porción del mismo), el especialista apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en este documento, que tales anticuerpos de competencia y/o competencia cruzada están incluidos y pueden ser útiles para los procedimientos descritos en este documento.

Con un anticuerpo con un epítopo que se "solapa" con otro (segundo) epítopo o con una superficie en PCSK9 que interacciona con el dominio similar

a EGF del LDLR se quiere decir que comparte espacio en términos de los restos de PCSK9 con los que interacciona. Para calcular el porcentaje de solapamiento, por ejemplo, el porcentaje de solapamiento del epítipo de PCSK9 del anticuerpo reivindicado con la superficie de PCSK9 que interacciona con el dominio similar a EGF de LDLR, el área superficial de PCSK9 oculta cuando forma complejo con el LDLR, se calcula en una base por resto. El área oculta también se calcula para estos restos en el complejo de PCSK9:anticuerpo. Para evitar más del 100% de posible solapamiento, el área superficial para restos que tienen una mayor área superficial oculta en el complejo de PCSK9:anticuerpo que en el complejo de LDLR:PCSK9 se ajusta hasta valores del complejo de LDLR:PCSK9 (100%). El porcentaje de solapamiento de superficie se calcula sumando todos los restos de interacción de LDLR:PCSK9 y se pondera por el área de interacción.

Una “región Fc funcional” posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Las “funciones efectoras” ilustrativas incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar mediante el uso de diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpo.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc

127
130

- encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia nativa debido a al menos una modificación de aminoácidos, aunque conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa.
- 5 Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y, preferiblemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos
- 10 en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en este documento poseerá preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80% con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y, mucho más preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos
- 15 aproximadamente el 90% con la misma, más preferiblemente, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% con la misma.

- Como se usa en este documento, "tratamiento" es una estrategia para
- 20 obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: mejora del aclaramiento de LDL y reducción de incidencia o mitigación de niveles aberrantes de colesterol y/o lipoproteína que se producen por trastornos metabólicos y/o de alimentación o
- 25 que incluyen hipercolesterolemia familiar, dislipidemia aterógena, aterosclerosis

y, de forma más general, enfermedad cardiovascular (CVD).

“Reducir la incidencia” significa cualquiera de reducir la gravedad (que puede incluir reducir la necesidad de y/o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias usados generalmente para esta afección. Como se entiende por los especialistas en la técnica, los individuos pueden variar en términos de su respuesta a tratamiento y, como tal, por ejemplo, un “procedimiento para reducir incidencia” refleja administrar el anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 basándose en una expectativa razonable de que tal administración probablemente puede provocar una reducción de este tipo en la incidencia en ese individuo particular.

“Mitigar” significa una disminución o mejora de uno o más síntomas en comparación con no administrar un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9. “Mitigar” también incluye acortamiento o reducción en la duración de un síntoma.

Como se usa en este documento, una “dosificación eficaz” o “cantidad eficaz” de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para realizar uno cualquiera o más resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retrasar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir hipercolesterolemia o uno o más síntomas de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o cardiopatía coronaria, disminuir la dosis de otras

128
137

medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otra medicación y/o retrasar la progresión de la enfermedad de pacientes. Una dosificación eficaz se puede administrar en una o más administraciones. Para los propósitos de esta invención, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir un tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica se puede conseguir o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una "dosificación eficaz" se puede considerar en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos y se puede considerar dar un único agente en una cantidad eficaz si, junto con uno o más otros agentes, se puede conseguir o se consigue un resultado deseable.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferiblemente, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero sin limitación, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Como se usa en este documento, "vector" significa una construcción que es capaz de suministrar y, preferiblemente, expresar uno o más genes o secuencia o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores víricos, vectores de expresión de ADN desnudo o ARN, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en este documento, "secuencia de control de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o uno inducible o un potenciador.

5 La secuencia de control de la expresión está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico a transcribir.

Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un ingrediente activo, permite que el

10 ingrediente conserve la actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los Ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para administración en

15 aerosol o parenteral son solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina normal (0,9%). Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990; y Remington, The

20 Science and Practice of Pharmacy, 20a Ed., Mack Publishing, 2000).

El término " k_{on} ", como se usa en este documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo a un antígeno. Específicamente, las constantes de velocidad (k_{on} y k_{off}) y las constantes de disociación en equilibrio se miden usando fragmentos de anticuerpo Fab (es

25 decir, univalentes) y PCSK9.

129
132

El término " k_{off} ", como se usa en este documento, se refiere a la constante de velocidad para disociación de un anticuerpo de un complejo de anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", como se usa en este documento, se refiere a la
5 constante de disociación en equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno.

A. Procedimientos para prevenir o tratar trastornos asociados con hipercolesterolemia

10 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir hipercolesterolemia, y/o al menos un síntoma de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o cardiopatía coronaria, en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo o péptido o aptámero antagonista de PCSK9 que antagoniza PCSK9 circulante.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona una cantidad eficaz de un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 que antagoniza PCSK9 circulante para el uso en el tratamiento o la prevención de hipercolesterolemia y/o al menos un síntoma de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o cardiopatía coronaria en un individuo. La invención proporciona además
20 el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 que antagoniza PCSK9 extracelular o circulante en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir hipercolesterolemia y/o al menos un síntoma de dislipidemia, aterosclerosis, CVD o cardiopatía coronaria en un individuo.

25 Ventajosamente, la administración terapéutica del anticuerpo, péptido o

aptámero da como resultado menos colesterol en sangre y/o menos LDL en sangre. Preferiblemente, el colesterol en sangre y/o LDL en sangre es al menos aproximadamente el 10% o el 15% menor que antes de la administración. Más preferiblemente, el colesterol en sangre y/o LDL en sangre es al menos aproximadamente el 20% menor que antes de la administración del anticuerpo. Aún más preferiblemente, el colesterol y/o LDL en sangre es al menos el 30% menor que antes de la administración del anticuerpo. Ventajosamente, el colesterol en sangre y/o LDL en sangre es al menos el 40% menor que antes de la administración del anticuerpo. Más ventajosamente, el colesterol en sangre y/o LDL en sangre es al menos el 50% menor que antes de la administración del anticuerpo. Muy preferiblemente, el colesterol en sangre y/o el LDL en sangre es al menos el 60% menor que antes de la administración del anticuerpo. Lo más preferiblemente, el colesterol en sangre y/o LDL en sangre es al menos el 70% menor que antes de la administración del anticuerpo.

Con respecto a todos los procedimientos descritos en este documento, la referencia a anticuerpos, péptidos y aptámeros antagonistas de PCSK9 también incluyen composiciones que comprenden uno o más agentes adicionales. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que se conocen bien en la técnica. La presente invención se puede usar sola o en combinación con otros procedimientos de tratamiento convencionales.

El anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 se puede administrar a un individuo mediante cualquier vía adecuada. Debe ser evidente para un especialista en la técnica que los ejemplos descritos en este

documento no tienen por objeto ser limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como inyección en embolada o por infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracefalorraquídea, transdérmica, subcutánea, intra-articular, por vía sublingual, intrasínovial, por insuflación, intratecal, oral, inhalación o tópica. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa, o localizada. Los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas, que incluyen nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos, son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 se puede aerosolizar usando una formulación de fluorocarburo y un inhalador de dosis graduada o inhalar como un polvo liofilizado y molido.

En una realización, un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 se administra por técnicas de suministro específicas de sitio o locales dirigidas. Los ejemplos de técnicas de suministro específicas de sitio o dirigidas de forma local incluyen diversas fuentes implantables de liberación prolongada del anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 o catéteres de suministro local, tales como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres de aguja, injertos sintéticos, envolturas de la adventicia, derivaciones y endoprótesis vasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo,

la Publicación PCT N° WO 00/53211 y la Patente de Estados Unidos N° 5.981.568.

Se pueden usar diversas formulaciones de un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 para la administración. En algunas realizaciones, el anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 se puede administrar puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en diversas formulaciones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación, tampones y mejoradores de la penetración cutánea. Los excipientes así como formulaciones para suministro de fármaco parenteral y no parenteral se exponen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20a Ed., Mack Publishing (2000).

Estos agentes se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, dosis, sincronización y repetición dependerá del individuo particular y el historial médico de ese individuo.

Los anticuerpos PCSK9 también se pueden administrar por inhalación, como se describe en este documento. Generalmente, para la administración de anticuerpos PCSK9, una dosificación candidata inicial puede ser

131
131

aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente cualquiera de aproximadamente 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado

5 anteriormente. Por ejemplo, la dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg se puede usar. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar una supresión deseada de

10 síntomas o hasta que se consiguen suficientes niveles terapéuticos, por ejemplo, para reducir los niveles de LDL en sangre. Un régimen de dosificación ilustrativo comprende administrar una dosis inicial aproximadamente 2 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo de PCSK9 o seguido de una dosis de mantenimiento de

15 aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de decaimiento farmacocinético que el médico desea conseguir. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se considera la dosificación de una a cuatro veces por semana. En otras realizaciones se considera la dosificación una vez al mes o una vez

20 cada dos meses o cada tres meses. El progreso de esa terapia se controla de forma sencilla por técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (que incluye el antagonista o antagonistas de PCSK9 usados) puede variar a lo largo del tiempo.

Para el propósito de la presente invención, la dosificación apropiada de

25 un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 dependerá del

anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 (o composiciones de los mismos) empleados, el tipo y la gravedad de los síntomas a tratar, si el agente se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y respuesta al agente, los niveles de PCSK9 en sangre del paciente, la síntesis y velocidad de aclaramiento del paciente para PCSK9, la velocidad de aclaramiento del paciente para el agente administrado y el criterio del médico a cargo del caso. Típicamente, el clínico administrará un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 hasta que se logre una dosificación que consiga el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia se pueden variar a lo largo del desarrollo del ciclo del tratamiento. Las consideraciones empíricas, tales como la semivida, contribuirán generalmente a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, los anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos completos, se pueden usar para prolongar la semivida del anticuerpo y para evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración se determinará y ajustará a lo largo del ciclo de terapia y se basa, generalmente, pero no necesariamente, en el tratamiento y/o la supresión y/o la mitigación y/o el retraso de síntomas, por ejemplo, hipercolesterolemia. Alternativamente, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos antagonistas de PCSK9. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para conseguir la liberación sostenida.

En una realización, las dosificaciones para un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista se pueden determinar empíricamente en individuos a los que se ha dado una o más administraciones de un anticuerpo, péptido o

132
135

aptámero antagonista. A los individuos se les dan dosificaciones incrementales de anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9. Para evaluar la eficacia, se puede seguir un indicador de la enfermedad.

La administración de un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 de acuerdo con el procedimiento en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o prolifáctico y otros factores conocidos por médicos especialistas. La administración de anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 puede ser esencialmente continua a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado o puede estar en una serie de dosis separadas.

En algunas realizaciones, puede estar presente más de un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más anticuerpos y/o péptidos antagonistas diferentes. Generalmente, los anticuerpos o péptidos antagonistas de PCSK9 pueden tener actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 también se puede usar junto con otros antagonistas de PCSK9 o antagonistas de receptor de PCSK9. Por ejemplo, se puede usar uno o más de los siguientes antagonistas de PCSK9: una molécula antisentido dirigida contra un PCSK9 (que incluye una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica PCSK9), un compuesto inhibidor de PCSK9 y un análogo estructural de PCSK9. También se puede usar un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 junto con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de los agentes.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; 5 cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); 10 proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa 15 o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 se preparan por procedimientos conocidos en la 20 técnica, tales como los que se describen en Epstein, y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688; Hwang, y col., 1980, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 4030 y las Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación mejorado se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Los liposomas particularmente útiles se pueden 25 generar por el procedimiento de evaporación de fase inversa con una

composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

- 5 Los ingredientes activos también se pueden incluir en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de
- 10 albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20a Ed., Mack Publishing (2000).

- Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices
- 15 semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919),
- 20 copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), acetato de sacarosa, isobutirato y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

- 25 Las formulaciones a usar para administración *in vivo* tienen que ser

estériles. Esto se consigue de forma sencilla mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de esterilización por filtración. Las composiciones de anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 terapéuticas se ponen de forma general en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón que se puede perforar por una aguja de inyección hipodérmica.

Las emulsiones adecuadas se pueden preparar usando emulsiones de grasa disponible en el mercado, tales como IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM y LipiphysanTM. El ingrediente activo se puede disolver en una composición de emulsión pre-mezclada o alternativamente se puede disolver en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de colza, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y una emulsión formada después de la mezcla con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta el 20% de aceite, por ejemplo, entre el 5 y el 20%. La emulsión de grasa puede comprender gotas de grasa entre 0,1 y 1,0 μm , particularmente 0,1 y 0,5 μm y tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas por la mezcla de un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 con IntralipidTM o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u

orgánicos o mezclas de los mismos y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha indicado anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles se pueden nebulizar mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede unir a una máscara facial, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Se pueden administrar composiciones en solución, suspensión o de polvo, preferiblemente por vía oral o por vía nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de un modo apropiado.

B. Antagonistas de PCSK9

Los procedimientos de la invención usan un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9, que se refiere a cualquier molécula peptídica o de ácido nucleico que bloquea, suprime o reduce (incluyendo reduce significativamente) la actividad biológica de PCSK9, incluyendo rutas cadena bajo mediadas por la señalización de PCSK9, tales como provocación de una respuesta celular a PCSK9.

Un anticuerpo, péptido o aptámero antagonista de PCSK9 debe mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a PCSK9; (b) bloquear la interacción de PCSK9 con el LDLR; (c) bloquear o disminuir la regulación por disminución mediada por PCSK9 del LDLR; (d) inhibir la disminución mediada por PCSK9 en el aclaramiento sanguíneo de LDL, (e)

aumentar el aclaramiento de LDL en medio por hepatocitos cultivados, (f) aumentar el aclaramiento de LDL sanguíneo por el hígado *in vivo*, (g) sensibilizar frente a estatinas y (h) bloquear la interacción de PCSK9 con otros factores todavía a identificar.

5 Para los propósitos de esta invención, el anticuerpo, péptido o aptámero reacciona preferiblemente con PCSK9 de un modo que inhibe la función de señalización de PCSK9 y la interacción con LDLR. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 reconoce específicamente PCSK9 de primate. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 se une
10 a PCSK9 de primate y roedor.

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, cadena única (ScFv),
15 mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glucosilación de
20 anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser de origen murino, de rata, humano o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 es un
25 anticuerpo monoclonal. El anticuerpo antagonista de PCSK9 también puede

estar humanizado. En otras realizaciones, el anticuerpo es humano.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmune. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624; Publicación PCT N° WO99/58572; y/o la Solicitud de Patente de RU N° 9809951.8. El Fc puede ser IgG₂ humana o IgG₄ humana. El Fc puede ser IgG₂ humana que contiene la mutación A330P331 a S330S331 (IgG_{2Δa}), en la que los restos de aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG₂ de tipo natural. Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG₄ que comprende las siguientes mutaciones (Armour y col., 2003, Molecular Immunology 40 585-593): E233F234L235 a P233V234A235 (IgG_{4Δc}), en la que la numeración es con referencia a la IgG₄ de tipo natural. En otra realización más, el Fc es IgG₄ humana E233F234L235 a P233V234A235 con delección G236 (IgG_{4Δb}). En otra realización el Fc es Fc de cualquier IgG₄ humana (IgG₄, IgG_{4Δb} o IgG_{4Δc}) que contiene una mutación que estabiliza la bisagra S229 a P228 (Aalberse y col., 2002, Immunology 105, 9-19). En otra realización, el Fc puede ser Fc aglucosilado.

En algunas realizaciones, la región constante está aglucosilada por mutación del resto de unión a oligosacárido (tal como Asn297) y/o restos marco conservados que son parte de la secuencia de reconocimiento de glucosilación en la región constante. En algunas realizaciones, la región constante está aglucosilada para glucosilación ligada a N enzimáticamente. La región

constante puede estar aglucosilada para glucosilación ligada a N enzimáticamente o por expresión en una célula huésped deficiente en glucosilación.

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista de PCSK9 para PCSK9 (tal como PCSK9 humano)) puede ser de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 2 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es inferior a cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 2 pM.

Un modo para determinar la afinidad de unión de anticuerpos para PCSK9 es por la medición de la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) se puede escindir con papaína o expresar recombinantemente. La afinidad de un fragmento Fab de PCSK9 de un anticuerpo se puede determinar por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore3000™, Biacore, INC, Piscataway NJ) equipado con chips detectores

de estreptavidina pre-inmovilizada (SA) mediante el uso de tampón de procesamiento HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005% v/v). El PCSK9 humano biotinilado (o cualquier otro PCSK9) se puede diluir en tampón HBS-EP hasta una concentración inferior a 0,5 µg/ml e inyectar a través de los canales de chip individuales mediante el uso de tiempos de contacto variables, para conseguir dos intervalos de densidad de antígeno, 50-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados u 800-1.000 RU para ensayos de exploración. Los estudios de regeneración han mostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v elimina de forma eficaz el Fab unido mientras que mantiene la actividad de PCSK9 en el chip durante más de 200 inyecciones. Típicamente, se inyectan diluciones seriadas (que abarcan concentraciones de 0,1-10x de K_D estimada) de muestras de Fab purificadas durante 1 min a 100 µl/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis en SDS-PAGE mediante el uso de un Fab de concentración conocida (como se determina por análisis de aminoácidos) como un patrón. Las velocidad de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas se obtienen simultáneamente ajustando los datos de manera global a un modelo de unión Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. Methods Enzymology 6. 99-110) mediante el uso del programa BIAevaluation. Los valores de constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para el uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier PCSK9, incluyendo PCSK9 humano, PCSK9 de otro mamífero (tal como PCSK9 de ratón, PCSK9 de rata, PCSK de primate), así como diferentes

formas de PCSK9 (tales como forma α y β). La afinidad de unión de un anticuerpo se mide generalmente a 25°C, pero también se puede medir a 37°C.

Los anticuerpos antagonistas de PCSK9 se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo el procedimiento
5 proporcionado en el Ejemplo 1. La vía y el programa de inmunización del animal huésped generalmente están de acuerdo con técnicas establecidas y convencionales para estimulación y producción de anticuerpo, como se describe adicionalmente en este documento. Se conocen en la técnica procedimientos generales para la producción de anticuerpos humanos y de
10 ratón y/o se describen en este documento. Un procedimiento actualmente preferido de preparación de los anticuerpos comprende la inmunización de animales *knock out* PCSK9 (PCSK9 $-/-$) como se describe en este documento.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o células productoras de anticuerpo de los mismos se puede manipular para
15 servir como base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamíferos, incluyendo humanas. Típicamente, el animal huésped se inyecta por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en este documento.

20 Se pueden preparar hibridomas a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C., 1975, *Nature* 256: 495-497 o como se modificó por Buck, D. W., y col., 1982, *In Vitro*, 18: 377-381. En la hibridación se pueden usar líneas de miolema disponibles, incluyendo, pero sin limitación,
25 X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif.,

137
140

Estados Unidos. En general, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un agente de fusión tal como polietilenglicol o por medios eléctricos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de cultivo selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT) para eliminar células parentales no hibridadas. Se puede usar cualquiera de los medios descritos en este documento, complementados con o sin suero, para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden usar células B inmortalizadas con EBV para producir los anticuerpos monoclonales de PCSK9 de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea y los sobrenadantes se ensayan para determinar la actividad anti-inmunógeno mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden usar como una fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células progenie de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para PCSK9 o una parte de las mismas.

Se pueden cultivar hibridomas que producen tales anticuerpos *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar del medio de cultivo o fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si existe,

se puede eliminar, por ejemplo, procesando la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un PCSK9 humano o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunógena en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), *N*-hidroxisuccinimida (a través de de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo antagonista de PCSK9 (monoclonal o policlonal) de interés se puede secuenciar y después la secuencia polinucleotídica se puede clonar en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en el vector en una célula huésped y después la célula huésped puede expandirse y congelarse para un uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular se puede realizar a través de la clonación de genes de anticuerpo de células B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tiller y col., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; Patente de Estados Unidos Nº 7.314.622.

En una alternativa, la secuencia polinucleotídica se puede usar para manipulación genética para “humanizar” el anticuerpo o para mejorar la

afinidad u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede modificar por ingeniería genética para que se parezca más a regiones constantes humanas para evitar una respuesta inmune si se usa el anticuerpo en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable
5 manipular genéticamente la secuencia de anticuerpo para obtener una mayor afinidad para PCSK9 y una mayor eficacia en la inhibición de PCSK9. Será evidente para un especialista en la técnica que se puedan realizar uno o más cambios polinucleotídicos en el anticuerpo antagonista de PCSK9 y todavía mantener su capacidad de unión a PCSK9.

10 Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida; (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco conservada de anticuerpo usar durante el procedimiento de
15 humanización; (3) las metodologías/técnicas de humanización reales; y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089 y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizado" que
20 comprenden un sitio de unión a antígeno obtenido a partir de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificadas y sus CDR asociadas fusionadas a dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col., 1991, Nature 349: 293-299; Lobuglio y col., 1989, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 86:
25 4220-4224; Shaw y col., 1987, J. Immunol. 138: 4534-4538; y Brown y col.,

1987, Cancer Res. 47: 3577-3583. Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región marco conservada de soporte humana (FR) antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y col., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen y col., 5 1988, Science 239: 1534-1536; y Jones y col., 1986, Nature 321: 522-525. Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones marco conservadas de roedor modificadas por ingeniería genética de forma recombinante. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la 10 respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo de roedor anti-humano que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de tales restos en destinatarios humanos. Por ejemplo, la región constante de anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética de forma que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, que no desencadene lisis por 15 complemento). Véase, por ejemplo, Publ. PCT N° WO99/58572; Solicitud de Patente del Reino Unido N° 9809951.8. Otros procedimientos para humanizar anticuerpos que también se pueden utilizar se describen por Daugherty y col., 1991, Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476 y en las Patentes de Estados Unidos N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la 20 Publ. PCT N° WO 01/27160.

En otra alternativa más, se pueden obtener anticuerpos completamente humanos usando ratones disponibles en el mercado que se han modificado por ingeniería genética para expresar proteínas inmunoglobulinas humanas específicas. Los animales transgénicos que están diseñados para producir una 25 respuesta inmune más deseable o más sólida también se pueden usar para la

139
H2

generación de anticuerpos humanizados o humanos. Los Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse[™] de Abgenix, Inc. (Fremont, CA), HuMAb-Mouse® y TC Mouse[™] de Medarex, Inc. (Princeton, NJ) y el ratón VelocImmune® de Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Tarrytown, NY).

- 5 En una alternativa, se pueden preparar anticuerpos de forma recombinante y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, se pueden preparar anticuerpos de forma recombinante mediante tecnología de presentación en fago. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y
- 10 6.265.150; y Winter y col., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455. Como alternativa, la tecnología de presentación en fago (McCafferty y col., 1990, Nature 348: 552-553) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con
- 15 esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan en fase de lectura en un gen de proteína de cubierta principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de hélice única del genoma del fago,
- 20 las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de las células B. La presentación en fago se puede realizar en una diversidad de formatos; véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., 1993,
- 25 Current Opinion in Structural Biology 3: 564.571. Se pueden usar varias fuentes

de segmentos génicos V para presentación en fago. Clackson y col., 1991, Nature 352: 624-628 aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V obtenidos de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo básicamente las técnicas descritas por Mark y col., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597 o Griffith y col., 1993, EMBO J. 12: 725-734. En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpo acumulan mutaciones a gran velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad y las células B que presentan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y diferencian preferentemente durante la exposición a antígeno posterior. Este procedimiento natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "intercambio de cadena". (Marks y col., 1992, Bio/Technol. 10: 779-783). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenida mediante presentación en fago se puede mejorar reemplazando secuencialmente los genes de la región V de las cadenas pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de pM-nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpo de fago muy grandes (también conocida como "la madre de todas las bibliotecas") se ha descrito por Waterhouse y col., 1993, Nucl. Acids Res. 21: 2265-2266. También se puede usar el barajado de genes para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo

140
A3

humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se denomina "huella epitópica", el gen de dominio V de cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedores obtenidos mediante la técnica de presentación en fago se reemplaza
5 con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras de roedor-humano. La selección de antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restablecer un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo rige (imprime) la elección de compañero. Cuando el procedimiento se repite para reemplazar el dominio V
10 de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase Publ. PCT N° WO 93/06231). A diferencia de humanización tradicional de anticuerpos de roedor mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos marco conservados o de CDR de origen de roedor.

15 Es evidente que aunque la discusión anterior se refiere a anticuerpos humanizados, los principios generales analizados son aplicables para adaptar anticuerpos para uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Adicionalmente es evidente que se pueden combinar uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descritos en este documento,
20 por ejemplo, injerto de CDR, mutación de marco conservada y mutación de CDR.

Se pueden preparar anticuerpos de forma recombinante aislando en primer lugar los anticuerpos y células productoras de anticuerpo de animales huésped, obteniendo la secuencia génica y usando la secuencia génica para
25 expresar el anticuerpo de forma recombinante en células huésped (por

ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que se puede emplear es expresar la secuencia de anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito procedimientos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, 2001, y
5 col., Vaccine 19: 2756; Lonberg, N. y D. Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol 13:65; y Pollock, y col. 1999, J Immunol Methods 231: 147. Los procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena única, etc. se conocen en la técnica.

También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de separación
10 por citometría de flujo tales como separación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para PCSK9.

Los anticuerpos se pueden unir a muchos vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de vehículos conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas,
15 vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los especialistas en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unión de anticuerpos o serán capaces de evaluar los mismos, usando experimentos de rutina. En algunas realizaciones, el vehículo
20 comprende un resto que se dirige al miocardio.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales).
25 Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una

vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión (tales como vectores de expresión descritos en la Publ. PCT N° WO 87/04462), que después se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, Publ. PCT N° WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col., 1984, Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal de PCSK9 de este documento.

Los anticuerpos antagonistas de PCSK9 y polipéptidos derivados de anticuerpos se pueden identificar o caracterizar usando procedimientos conocidos en la técnica, mediante los que se detecta y/o mide una reducción, mejora o neutralización de la actividad biológica de PCSK9. En algunas realizaciones, se identifica un anticuerpo o polipéptido antagonista de PCSK9 incubando un agente candidato con PCSK9 y controlando la unión y/o reducción o neutralización relacionada de una actividad biológica de PCSK9. El ensayo de unión se puede realizar con polipéptido o polipéptidos de PCSK9 purificados o con células que expresan de forma natural o transfectadas para expresar, polipéptido o polipéptidos de PCSK9. En una realización, el ensayo

de unión es un ensayo de unión competitiva, donde se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista de PCSK9 conocido por la unión a PCSK9. El ensayo se puede realizar en diversos formatos, incluyendo el formato de ELISA. En otras realizaciones, se identifica un
5 anticuerpo antagonista de PCSK9 incubando un agente candidato con PCSK9 y controlando la unión e inhibición relacionada de la expresión de LDLR y/o aclaramiento de colesterol sanguíneo.

Después de la identificación inicial, se puede confirmár adicionalmente la actividad de un anticuerpo antagonista de PCSK9 candidato y perfeccionarse
10 mediante bioensayos que se sabe que ensayan las actividades biológicas fijadas como objetivo. Como alternativa, se pueden usar bioensayos para explorar directamente candidatos. Algunos de los procedimientos para identificar y caracterizar anticuerpos, péptidos o aptámeros antagonistas de PCSK9, se describen con detalle en los Ejemplos.

15 Se pueden caracterizar anticuerpos antagonistas de PCSK9 usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al que se une o “cartografiado de epítipo”. Existen muchos procedimientos conocidos en la técnica para cartografiar y caracterizar la localización de epítipos en proteínas, incluyendo resolver la estructura
20 cristalina de un complejo de anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999). En un ejemplo adicional, se puede
25 usar el cartografiado de epítipos para determinar la secuencia a la que se une

un anticuerpo antagonista de PCSK9. El cartografiado de epítomos está disponible en el mercado de varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítopo puede ser un epítopo lineal, es decir, contenido en un tramo único de aminoácidos o un
5 epítopo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no estar necesariamente contenidos en un tramo único. Se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, de forma recombinante) péptidos de longitudes variables (por ejemplo, de al menos 4-6 aminoácidos de longitud) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista de
10 PCSK9. En otro ejemplo, el epítopo al que se une el anticuerpo antagonista de PCSK9 se puede determinar en una exploración sistemática usando péptidos solapantes obtenidos de la secuencia de PCSK9 y determinando la unión por el anticuerpo antagonista de PCSK9. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, la fase de lectura abierta que codifica PCSK9 se
15 fragmenta aleatoriamente o mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de PCSK9 con el anticuerpo a ensayar. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse mediante PCR y después transcribirse y traducirse en proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos
20 de PCSK9 marcados radiactivamente se determina después mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También se pueden identificar determinados epítomos usando grandes bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias presentadas en la superficie de partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Como alternativa, se puede ensayar una biblioteca definida de
25 fragmentos de péptidos solapantes para determinar unión al anticuerpo de

ensayo en ensayos de unión sencilla. En un ejemplo adicional, se puede realizar mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominio y mutagénesis mediante alanina para identificar restos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión a epítipo. Por ejemplo, se
5 pueden realizar experimentos de intercambio de dominio usando un PCSK9 mutante en el que se han reemplazado (intercambiado) diversos fragmentos del polipéptido PCSK9 con secuencias de PCSK9 de otras especies o una proteína íntimamente relacionada pero antigénicamente diferente (tal como otro miembro de la familia de proproteína convertasa). Evaluando la unión del
10 anticuerpo al PCSK9 mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento de PCSK9 particular para la unión a anticuerpo.

Otro procedimiento más que se puede usar para caracterizar un anticuerpo antagonista de PCSK9 es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos
15 fragmentos en PCSK9, para determinar si el anticuerpo antagonista de PCSK9 se une al mismo epítipo que otros anticuerpos. Los especialistas en la técnica conocen bien ensayos de competición.

La estructura cristalina del anticuerpo y el complejo anticuerpo:antígeno también se pueden usar para caracterizar el anticuerpo. Los restos se
20 identifican calculando la diferencia en área superficial accesible entre la estructura cristalina de L1L3:PCSK9 y la estructura de PCSK9 en solitario. Los restos de PCSK9 que muestran área superficial oculta tras la formación de complejo con anticuerpo L1L3 se incluyen como parte del epítipo. La superficie accesible por disolvente de una proteína se define como el sitio del centro de
25 una esfera de sonda (que representa una molécula de disolvente de radio de

146
143

1,4 Å) a medida que rueda sobre la superficie de Van der Waals de la proteína. El área superficial accesible por disolvente se calcula generando puntos superficiales sobre una esfera extendida alrededor de cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma de los radios del átomo y la sonda) y eliminando los que se encuentran dentro de esferas equivalentes asociadas con átomos vecinos, como se aplica en el programa AREAIMOL (Briggs, P. J., 2000, CCP4 Newsletter N° 38, CCLRC, Daresbury).

Puede usarse un vector de expresión para dirigir la expresión de un anticuerpo antagonista de PCSK9. Un especialista en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por catéter y administración tópica. En otra realización, el vector de expresión se administra directamente al tronco o ganglio simpático o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

También puede usarse el suministro dirigido de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Se describen técnicas de suministro de ADN mediadas por receptor en, por ejemplo, Findeis y col., 1993, Trends Biotechnol. 11: 202; Chiou y col., 1994, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.); Wu y col., 1988, J. Biol. Chem. 263: 621; Wu y col., 1994, J. Biol. Chem. 269: 542; Zenke y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3655; Wu y col., 1991, J. Biol. Chem. 266: 338. Se administran

composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 μ g a aproximadamente 500 μ g y de aproximadamente 20 μ g a aproximadamente 100 μ g de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden suministrarse usando vehículos de suministro de genes. El vehículo de suministro de genes puede ser de origen viral o no viral (véase, en general, Jolly, 1994, Cancer Gene Therapy 1: 51; Kimura, 1994, Human Gene Therapy 5: 845; Connelly, 1995, Human Gene Therapy 1: 185; y Kaplitt, 1994, Nature Genetics 6: 148). Puede inducirse la expresión de dichas secuencias codificantes usando promotores endógenos de mamíferos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o estar regulada.

Se conocen bien en la técnica vectores basados en virus para suministro de un polinucleótido deseado y expresión en una célula deseada. Los vehículos basados en virus ejemplares incluyen, pero sin limitación, retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, Publ. PCT N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de Estados Unidos N° 5.219.740 y 4.777.127, Patente del Reino Unido N° 2.200.651; y Patente EP N° 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), vectores de virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923;

ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y virus adenosociados (AAV) (véase, por ejemplo, Publ. PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN unido a adenovirus muertos como se describe en Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3: 147.

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de suministro no virales, incluyendo, pero sin limitación, ADN condensado policationico unido o no unido a adenovirus muertos en solitario (véase, por ejemplo, Curiel, 1992, Hum. Gene Ther. 3: 147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J., 1989, Biol. Chem. 264: 16985); células vehículo de suministro de células eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.814.482; Publ. PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización de carga de nucleico o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la Publicación PCT N° WO 90/11092 y Patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Se describen liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro de genes en la Patente de Estados Unidos N° 5.422.120; Publ. PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0524968. Se describen estrategias adicionales en Philip, 1994, Mol. Cell Biol., 14: 2411 y en Woffendin, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 1581.

Esta invención incluye composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos descritos en este documento o fabricados por los procedimientos y que tienen las características descritas en este documento. Como se usan en este documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos, péptidos o aptámeros que antagonizan la

interacción de PCSK9 con el LDLR y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos o péptidos. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo
5 tampones, que son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos y péptidos antagonistas de PCSK9 de la invención se caracterizan por cualquiera (una o más) de las siguientes características: (a) se unen a PCSK9; (b) bloquean la interacción de PCSK9 con el LDLR; (c) disminuyen la regulación por disminución mediada por PCSK9 del LDLR; y (d)
10 inhiben la inhibición mediada por PCSK9 del aclaramiento sanguíneo de LDL. Preferiblemente, los anticuerpos de PCSK9 tienen dos o más de estas características. Más preferiblemente los anticuerpos tienen tres o más de las características. Más preferiblemente los anticuerpos tienen las cuatro las características.

15 Por consiguiente, la invención proporciona cualquiera de los siguientes, o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquier anticuerpo que tiene una secuencia de cadena ligera parcial y una secuencia de cadena pesada parcial como se encuentra en la Tabla 1. Las secuencias subrayadas son secuencias de CDR de acuerdo con Kabat y en
20 negrita de acuerdo con Chothia.

mAb	Región Variable de Cadena Ligera	Región Variable de Cadena Pesada
4A5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRV SVTC <u>KASQNVGTNVA</u> WYQ	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS GYTFTDYYMNWVKQSHGKSLEWIG

145
148

mAb	Región Variable de Cadena Ligera	Región Variable de Cadena Pesada
	QKPGQSPKALIY <u>SASYRYS</u> G	<u>DINPNNGG</u> TTYNQKFKGKATLTVDKS
	VPDRFTGSGSGTDFTLTISN	YSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR <u>WL</u>
	VLSEDLAEYFC <u>QQFYSPY</u> T	<u>LFAYWG</u> QGTTLTVSA (SEC ID N°: 20)
	FGGGTKLEIK (SEC ID. N°: 16)	
5A10	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVS	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAS
	ITC <u>KASQDVSTAV</u> AWYQQK	<u>GYTFTSYWMH</u> WVKQRPGQGLEWIG
	PGQSPKLLIY <u>SASYRYT</u> GVP	<u>EINPSNGRT</u> NYNEKFKSKATLTVDKS
	DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ	SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR <u>ER</u>
	DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ	<u>PLYAMDYWG</u> QGTSTVTSS
	AEDLAVYYC <u>QQRYSTP</u> RTF	(SEC ID N°: 21)
	GGGTKLEIK (SEC ID N°: 17)	
6F6	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTI	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKAS
	SC <u>SASQGSNYLN</u> WYQQKP	<u>GYTFTDY</u> YMNWVKQSHGKSLEWIG
	DGTVKLLIY <u>YTSSLHS</u> GVPS	<u>DINPNNGG</u> TSYNQKFKGKATLTVDK
	RFSGSGSGTDYSLTISNLEP	SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAG <u>G</u>
	EDIATYYC <u>QQYSKLP</u> FTFGS	<u>GIYYRYDRNYFDY</u> WGQGTTLTVSS
	GTKLEIK (SEC ID N°: 18)	(SEC ID N°: 22)

mAb	Región Variable de Cadena Ligera	Región Variable de Cadena Pesada
7D4	DIVMTQSHKFMSTSFQDRVS ITC <u>KASQDVSNALAWYQQK</u> PGHSPKLLIF <u>SASYRYT</u> GVP DRFTGSGSGTDFTFTISSVQ AEDLAVYYC <u>QQHYSTPWTF</u> GGGTKLEIK (SEC ID N°: 19)	EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTAS <u>GFTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVA</u> <u>NINYDGSNTSYLDSLKSRFIISRDNAK</u> NILYLQMSSSLKSEDTATYYCARE <u>EKFA</u> <u>AMDYWGQGTSVTVSS</u> (SEC ID N°: 23)
L1L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITC <u>RASQGISSALAWYQQKP</u> GKAPKLLY <u>SASYRYT</u> GVPS RFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYC <u>QQRYSLWRTFG</u> QGGTKLEIK (SEC ID N°: 53)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC <u>GYTFTSYMHWRQAPGQGLEWM</u> <u>GEISPFGGRTNYNEKFKSRVTMTRD</u> TSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARE <u>RPLYASDLWGQGTTVTVSS</u> (SEC ID N°: 54)

La invención también proporciona porciones de CDR de anticuerpos contra PCSK9 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat). La determinación de regiones CDR está bien dentro de la técnica especialista. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR pueden ser una combinación de las CDR de Kabat y de Chothia (también denominadas “CDR combinadas” o “CDR extendidas”). En algunas realizaciones, las CDR son las CDR de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en

146
149

realizaciones con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquier de Kabat, Chothia, CDR de combinación CDR o combinaciones de las mismas.

La invención también proporciona procedimientos de generación de cualquiera de estos anticuerpos o polipéptidos. Los anticuerpos de esta
5 invención pueden generarse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos individuales o de fusión) como se ha descrito anteriormente o mediante síntesis química. Se generan convenientemente polipéptidos de los anticuerpos,
10 especialmente polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, mediante síntesis química. Se conocen en la técnica procedimientos de síntesis química y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, un anticuerpo podría producirse mediante un sintetizador de polipéptido automático que emplee el procedimiento de fase sólida. Véase
15 también, las Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567; y 6.331.415.

En otra alternativa, los anticuerpos y péptidos pueden generarse de forma recombinante usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que
20 codifica las regiones variables de cadena pesada y/o cadena ligera de anticuerpo 4A5, 5A10, 6F6, 7D4 o L1L3. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede expandirse después y congelarse para un uso futuro. Se describen adicionalmente en este documento vectores (incluyendo vectores
25 de expresión) y células huésped.

La invención también incluye scFv de anticuerpos de esta invención. Se generan fragmentos de región variable de cadena única por unión de regiones variables de cadena ligera y/o pesada mediante el uso de un péptido de enlace corto. Bird y col., 1988, Science 242: 423-426. Un ejemplo de un péptido de
5 enlace es (GGGGS)₃ (SEC ID N°: 24), que genera un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxi terminal de una región variable y el extremo amino terminal de la otra región variable. Se han diseñado y usado enlazadores de otras secuencias. Bird y col., 1988, anteriormente. Los enlazadores deberían ser polipéptidos cortos y flexibles y preferiblemente
10 comprender menos de aproximadamente 20 restos de aminoácidos. A su vez los enlazadores pueden modificarse para funciones adicionales, tales como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena única pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automático. Para producción
15 recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped adecuada, eucariota tal como células de levaduras, plantas, insectos o mamíferos o procariotas tales como *E. coli*. Pueden generarse polinucleótidos que codifican el scFv de interés mediante manipulaciones de rutina tales como ligación de
20 polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la técnica.

Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos se incluyen también. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que se expresan dominios VH y VL en una cadena polipeptídica única
25 mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el

147
150

emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, formando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y generando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col., 1993, Proc. Natl. Acad Sci. USA 90: 6444-6449; Poljak, R. J. y col. 1994, Structure 2: 1121-1123).

Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tengan especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes, usando los anticuerpos descritos en este documento. Se conocen en la técnica procedimientos para generar anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Suresh y col., 1986, Methods in Enzymology 121: 210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basaba en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

De acuerdo con una estrategia para generar anticuerpos biespecíficos, se fusionan dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped

adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible
5 insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

En una estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por
10 una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica, facilita la
15 separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas. Esta estrategia se describe en la Publicación PCT N° WO 94/04690.

También se incluyen en el alcance de la invención anticuerpos heteroconjugados que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente.
20 Dichos anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune contra células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980) y para el tratamiento de infección por VIH (Publ. PCT N° WO 91/00360 y WO 92/200373; EP 03089). Pueden generarse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento adecuado. Se conocen bien en la técnica
25 agentes y procedimientos de entrecruzamiento adecuados y se describen en la

Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden
5 construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o por formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mecaptobutirimidato.

Pueden generarse anticuerpos humanizados que comprenden una o más CDR de anticuerpos 5A10 ó 7D4 o una o más CDR procedentes de los
10 anticuerpos 5A10 o 7D4, por ejemplo, usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables ligero y peso del anticuerpo de partida; (2) diseñar el anticuerpo humanizado,
15 es decir, decidir qué región marco conservada del anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización; (3) usar las metodologías/técnicas de humanización reales; y (4) transfectar y expresar anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089 y 6.180.370.

20 En los anticuerpos humanizados recombinantes, la porción Fc puede modificarse para evitar la interacción con receptor Fcγ y los sistemas del complemento e inmune. Las técnicas para preparación de dichos anticuerpos se describen en el documento WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para parecerse más a regiones
25 constantes humanas para evitar una respuesta inmune si se usa el anticuerpo

en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.997.878 y 5.866.692.

Pueden generarse anticuerpos humanizados que comprenden las regiones variables de cadena ligera o pesada o una o más CDR de un anticuerpo o sus variantes que se muestran en la Tabla 1, o una o más CDR derivadas del anticuerpo o sus variantes que se muestran en la Tabla 2 usando cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Pueden generarse anticuerpos humanizados por cualquier procedimiento conocido en la técnica.

La invención incluye modificaciones en los anticuerpos y polipéptidos de las variantes de la invención que se muestran en la Tabla 1, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y variantes que tienen una actividad y/o afinidad aumentada o disminuida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada a PCSK9. La modificación de polipéptidos es una práctica de rutina en la técnica y no es necesario describirla en detalle en este documento. La modificación de polipéptidos se ejemplifica en los Ejemplos. Los Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambien perjudicialmente significativamente la actividad funcional o que maduren (aumenten) la afinidad del polipéptido por su ligando, o uso de análogos químicos.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que

149
152

contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un marcador epitópico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N- o C-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

- Las variantes de sustitución tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo eliminado y un resto diferente insertado en su lugar.
- 10 Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 2 bajo el encabezado de "sustituciones conservativas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más
- 15 sustanciales denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 2 o como se describen adicionalmente a continuación en relación con las clases de aminoácidos, y los productos analizarse.

Tabla 2: Sustituciones de aminoácidos

Resto Original	Sustituciones conservativas	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala

Resto Original	Sustituciones conservativas	Sustituciones ejemplares
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr, Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo por selección de sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación

5 de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana,

o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) No polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 5 (3) Ácidos (cargados negativamente): Asp, Glu;
- (4) Básicos (cargados positivamente): Lys, Arg;
- (5) Restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Se realizan sustituciones no conservativas por intercambio de un
10 miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos anormales. Por el contrario, pueden añadirse uno o
15 varios enlaces de cisteína en el anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento de Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar de cambio o modificación de uno o más aminoácidos a un rediseño completo de una región,
20 tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad de unión y/o especificidad. En algunas realizaciones, no se realizan más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio de CDR. En otras realizaciones, no se realizan más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio de CDR. En
25 otras realizaciones más, el dominio de CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones post-traduccionales, tales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65: 111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol. 32: 1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29: 4175-4180) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar a la conformación y a la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Jefferis y Lund, anteriormente; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir a una glicoproteína dada a ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha descrito que la glicosilación de anticuerpos afecta a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En particular, se ha descrito que células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, mejoraba la actividad de ADCC (Umana y col., 1999, Nature Biotech. 17: 176-180).

Típicamente la glicosilación de anticuerpos está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión

151
151

enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido genera un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares *N*-acetilgalactosima, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente por alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligada a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución de, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligada a O).

El patrón de glicosilación de anticuerpos también puede modificarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende enormemente de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo celular usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales es rara vez la célula nativa, pueden esperarse variaciones en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse y col., 1997, J. Biol. Chem. 272: 9062-9070).

Además de la selección de células huésped, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de cultivo, formulación de medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para modificar el patrón de glicosilación conseguido en un

organismo huésped particular incluyendo introducir o sobreexpresar ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes de Estados Unidos N°: 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación o ciertos tipos de glicosilación pueden eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H), N-glicosidasa F, endoglicosada F1, endoglicosada F2, endoglicosada F3. Además, la célula huésped recombinante puede modificarse genéticamente para ser defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Se conocen bien en la técnica, estas técnicas y técnicas similares.

10 Otros procedimientos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden usarse modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayo. Se generan polipéptidos modificados usando procedimientos establecidos en la técnica y
15 pueden explorarse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica, describiéndose algunos de ellos a continuación y en los Ejemplos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no desencadena
20 lisis mediada por el complemento, no estimula ADCC, o no activa la microglía; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en uno cualquiera o más de los siguientes: desencadenamiento de lisis mediada por complemento, estimulación de ADCC o activación de microglía. Pueden usarse diferentes modificaciones de la región constante para conseguir
25 un nivel óptimo y/o la combinación de funciones efectoras. Véase, por ejemplo,

152
15

Morgan y col., 1995, Immunology 86: 319-324; Lund y col., 1996, J. Immunology 157: 4963-9 157: 4963-4969; Idusogie y col., 2000, J. Immunology 164: 4178-4184; Tao y col., 1989, J. Immunology 143: 2595-2601; y Jefferis y col., 1998, Immunological Reviews 163: 59-67. En algunas realizaciones, la

5 región constante está modificada como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624; Publicación PCT N° WO99/58572; y/o Solicitud de Patente del Reino Unido N° 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2 de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos

10 respecto a la secuencia de IgG2 de tipo natural). Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624. En otras realizaciones más, la región constante no se glicosila por glicosilación ligada a N. En algunas realizaciones, la región constante no se glicosila por glicosilación ligada a N por mutación del resto de aminoácido glicosilado o de restos marco conservados que son parte de la secuencia de

15 reconocimiento de N-glicosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glicosilación N297 puede mutarse a A, Q, K o H. Véase, Tao y col., 1989, J. Immunology 143: 2595-2601; y Jefferis y col., 1998, Immunological Reviews 163: 59-76. En algunas realizaciones, la región constante no se glicosila por glicosilación ligada a N. La región constante puede no glicosilarse por

20 glicosilación ligada a N enzimáticamente (tal como por eliminación del carbohidrato por enzima PNGasa) o por expresión en una células huésped de glicosilación deficiente.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación PCT N° WO 99/58572. Estos

25 anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la

molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a todo o parte de un dominio constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unir la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente de
5 complemento significativa o destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Esto se basa típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios C_H2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta forma son particularmente convenientes
10 para uso en terapia crónica con anticuerpos para evitar reacciones inflamatorias y otras reacciones adversas contra una terapia con anticuerpos convencional.

La invención incluye realizaciones de afinidad madurada. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos de afinidad madurada por procedimientos
15 conocidos en la técnica (Marks y col., 1992, *Bio/Technology*, 10: 779-783; Barbas y col., 1994, *Proc Nat. Acad. Sci., USA* 91: 3808-3813; Schier y col., 1995, *Gene*, 169: 147-155; Yelton y col., 1995, *J. Immunol.*, 155: 1994-2004; Jackson y col., 1995, *J. Immunol.*, 154(7): 3310-9; Hawkins y col., 1992, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896; y Publicación PCT N° WO2004/058184).

20 Pueden usarse los siguientes procedimientos para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Un modo de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de unión de un polipéptido, tal como un anticuerpo, denominado "mutagénesis de barrido de bibliotecas". Generalmente, la mutagénesis de barrido de bibliotecas funciona
25 de la forma siguiente. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se

- sustituyen con dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20) aminoácidos usando procedimientos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, uno para cada posición de aminoácido que se analiza), cada uno con una
- 5 complejidad de uno o más elementos (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Generalmente, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se exploran para determinar la
- 10 afinidad de unión al polipéptido diana (u otra diana de unión) y se identifican candidatos con una unión aumentada, igual, disminuida o que no se unen. Se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar la afinidad de unión. Puede determinarse la afinidad de unión usando análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore que detecta diferencias en la afinidad de unión
- 15 de aproximadamente dos veces o más. El Biacore es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida se une ya una afinidad relativamente elevada, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o inferior. La exploración usando resonancia de plasmón superficial Biacore se describe en los Ejemplos en este documento.
- 20 Puede determinarse la afinidad de unión usando Kinexa Biocensor, ensayos de centelleo por proximidad, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), interrupción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o presentación en levaduras. La afinidad de unión también puede explorarse usando un bioensayo adecuado.
- 25 En algunas realizaciones, cada posición de aminoácido en una CDR se

sustituye (en algunas realizaciones una cada vez) con los 20 aminoácidos naturales usando procedimientos de mutagénesis reconocidos en la técnica (describiéndose algunos de ellos en este documento) Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una para cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 elementos (si se sustituyen los 20 aminoácidos en cada posición).

En algunas realizaciones, la biblioteca a explorar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden ser en la misma CDR o en dos o más CDR. Por lo tanto, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La biblioteca puede comprender la sustitución en dos más posiciones en dos o más CDR. La biblioteca pueden comprender sustituciones en 3, 4, 5 o más posiciones, encontrándose dichas posiciones en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. La sustitución puede prepararse usando codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, la Tabla 2 de Balint y col., 1993, Gene 137(1): 109-18).

La CDR puede ser CDRH3 y/o CDRL3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y/o CDRH3. La CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia o una CDR extendida.

Pueden secuenciarse candidatos con unión mejorada identificando de este modo un mutante de sustitución de CDR que dé como resultado una afinidad mejorada (también denominada una sustitución "mejorada"). También pueden secuenciarse candidatos que se unan, identificando de este modo una sustitución de CDR que conserve la unión.

Pueden realizarse múltiples rondas de exploración. Por ejemplo, los candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución aminoacídica en una o

más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contenga al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, posición de aminoácido en la CDR en la que un mutante de sustitución mostraba unión
5 mejorada). Se analiza adicionalmente a continuación la preparación, exploración y selección de esta biblioteca.

La mutagénesis de barrido de bibliotecas también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en la medida en que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión disminuida o no unión también
10 proporcione información respecto a la importancia de cada posición de aminoácido para la estabilidad del complejo de anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR conserva la unión cuando se cambia por los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que es poco probable que sea necesaria para la unión a antígeno. Por el contrario, si una
15 posición de CDR conserva la unión en sólo un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para la función de la CDR. Por lo tanto, los procedimientos de mutagénesis de barrido de bibliotecas generan información respecto a posiciones en las CDR que pueden modificarse con muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20
20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que no puede modificarse o que pueden modificarse sólo con unos pocos aminoácidos.

Pueden combinarse candidatos con una afinidad mejorada en una segunda biblioteca, que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original y puede incluir además sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo
25 de la complejidad de la biblioteca que se desee o que se permita usando el

procedimiento de exploración o selección deseado. Además, si se desea, puede aleatorizarse una posición de aminoácido adyacente en al menos dos o más aminoácidos. La aleatorización de aminoácidos adyacentes puede permitir una flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante que a su vez
5 puede permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La biblioteca también puede comprender la sustitución en posiciones que no mostraban afinidad mejorada en la primera ronda de exploración.

La segunda biblioteca se explora o selecciona para elementos de biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier
10 procedimiento conocido en la técnica, incluyendo exploración usando análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore y selección usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para selección, incluyendo presentación en fagos, presentación en levaduras y presentación en ribosomas.

La invención también incluye proteínas de fusión que comprenden uno o
15 más fragmentos o regiones de los anticuerpos o polipéptidos de esta invención. En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de una región de cadena ligera variable que se muestra en la SEC ID N°: 53, 16, 17 ó 19 y/o al menos 10 aminoácidos de una región de cadena pesada variable que se muestra en las SEC ID N°: 54,
20 20, 21, 22 ó 23. En otras realizaciones, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al
25 menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos

aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena pesada variable. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada como se muestra en cualquiera de las pares de secuencias seleccionados de entre las
5 SEC ID N°: 53 y 54, 16 y 20, 17 y 21, 18 y 22 y 19 y 23. En otra realización, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR. En otras realizaciones más, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 (VH CDR3) y/o CDR L3 (VL CDR3). Para los fines de esta invención, una proteína de fusión contiene uno o más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la que no está unida en la
10 molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Las secuencias heterólogas ejemplares incluyen, pero sin limitación, un "marcador" tal como un marcador FLAG o un marcador 6His. Se conocen bien en la técnica marcadores.

Puede generarse un polipéptido de fusión por procedimientos conocidos
15 en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Típicamente, las proteínas de fusión de esta invención se generan por preparación de la expresión de un polinucleótido que las codifica usando procedimientos recombinantes descritos en este documento, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo,
20 síntesis química.

Esta invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos o polipéptidos conjugados (por ejemplo, unidos) con un agente que facilite el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para mayor simplicidad, se hará referencia en general a anticuerpos entendiendo
25 que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión

a y/o antagonista de PCSK9 descritas en este documento. La conjugación se refiere generalmente a la unión de estos componentes como se describe en este documento. La unión (que generalmente es fijación de estos componentes en asociación íntima al menos para la administración) puede conseguirse de
5 varias formas. Por ejemplo, es posible una reacción directa entre un agente y un anticuerpo cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido o con un grupo alquilo que contiene un
10 buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Un anticuerpo o polipéptido de esta invención puede unirse a un agente marcador tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen en la técnica marcadores que proporcionan generalmente (directa o indirectamente) una
15 señal.

La invención también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden, como evidencia esta descripción, cualquiera o todos los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en este documento.

20 La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y péptidos de la invención y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

Por consiguiente, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden
25 polinucleótidos que codifican cualquiera de lo siguiente: los anticuerpos 4A5,

156
159

5A10, 6F6, 7D4, L1L3 o cualquier fragmento o parte de los mismos que tienen la capacidad de antagonizar PCSK9.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en este documento, tales como anticuerpos y polipéptidos que tienen una función efectora alterada. Pueden generarse polinucleótidos y expresarse por procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo que se describe en este documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos o polipéptidos descritos en este documento. En otras realizaciones más, la composición comprende cualquiera o ambos polinucleótidos que se muestran en la SEC ID N°: 25 y SEC ID N°: 26. Se describen adicionalmente en este documento vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de fabricación de cualquiera de los polinucleótidos descritos en este documento.

También se incluyen en la presente invención polinucleótidos complementarios a cualquiera de dichas secuencias. Los polinucleótidos pueden ser de hélice única (codificantes o antisentido) o de doble hélice y pueden ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o moléculas de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn que contienen intrones y se

corresponden con una molécula de ADN de uno en uno y moléculas de ARNm que no contienen intrones. Pueden estar presentes secuencias codificantes o no codificantes adicionales, pero no necesariamente, dentro un polinucleótido de la presente invención y un polinucleótido puede, pero no necesariamente, unirse a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifique un anticuerpo o una porción del mismo) o pueden comprender una variante de dicha secuencia. Las variantes polinucleotídicas contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de modo que no se disminuya la inmunorreactividad del polipéptido codificado respecto a una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en este documento. Las variantes presentan preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente el 70%, más preferiblemente, una identidad de al menos aproximadamente el 80%, aún más preferiblemente una identidad de al menos aproximadamente el 90% y, más preferiblemente, una identidad de al menos aproximadamente el 95%, con una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo nativo o una porción del mismo.

Se dice que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima como se describe a continuación. Se realizan típicamente comparaciones entre dos secuencias por comparación de las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, se

refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75 o de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se
5 alineen de forma óptima.

Puede realizarse un alineamiento óptimo de secuencias para comparación usando el programa Megalign en la serie de programas bioinformáticos Lasergene (DNASTAR, Inc. Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento
10 descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M. O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure (National Biomedical Research Foundation, Washington DC), Vol. 5, Supl. 3, págs. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis págs. 626-
15 645 Methods in Enzymology vol. 183, (Academic Press, Inc., San Diego, CA); Higgins, D. G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5: 151-153; Myers, E. W. y Muller W., 1988, CABIOS 4: 11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11: 105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4: 406-425; Sneath, P. H. A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical
20 Taxonomy (Freeman Press, San Francisco, CA); Wilbur, W. J. y Lipman, D. J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 726-730.

Preferiblemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, donde la porción de la secuencia
25 polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede

comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento, o del 10 al 12 por ciento, en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se
5 calcula determinando el número posiciones en las que aparecen las bases de ácido nucleico o restos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para dar
10 el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes, también o como alternativa, pueden ser sustancialmente homólogas a un gen nativo o una porción o complementario del mismo. Dichas variantes polinucleotídicas son capaces de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN de origen natural que
15 codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

Las “condiciones moderadamente rigurosas” adecuadas incluyen prelavado en una solución de SSC 5X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50°C-65°C, SSC 5X durante una noche; seguido de lavado dos veces a 65°C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que
20 contiene SDS al 0,1%.

Como se usan en este documento, las “condiciones altamente rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad” son las que: (1) emplean una fuerza iónica reducida y una alta temperatura para lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) emplean
25 durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por

ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/ polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de Denhardt 5x, ADN de espermatozoos de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C con lavados a 42°C en SSC 0,2x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1x que contiene EDTA a 55°C. El especialista reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para adaptarse a factores tales como la longitud de sonda y similares.

Los especialistas en la técnica apreciarán que como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como el descrito en este documento. Algunos de estos polinucleótidos llevan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. No obstante, se contemplan específicamente en la presente invención polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones. Además, se incluyen en el alcance de la presente invención alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en este documento. Los alelos son genes endógenos que se modifican como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. El ARNm y la proteína resultantes pueden, pero necesariamente, tener una estructura o función alterada. Pueden identificarse alelos usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias de base de datos)

Los polinucleótidos de esta invención pueden obtenerse usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Se conocen bien en la técnica procedimientos de síntesis química de polinucleótidos y no es necesario describirlos en detalle en este documento. Un especialista en la técnica puede
5 usar las secuencias proporcionadas en este documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos usando procedimientos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado y el vector a su vez puede introducirse en una célula
10 huésped adecuada para replicación y amplificación, como se analiza adicionalmente en este documento. Pueden insertarse polinucleótidos en células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Se transforman células por introducción de un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, conjugación F o electroporación. Una vez introducido,
15 el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo puede aislarse de la célula huésped por procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, anteriormente.

20 Como alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de ADN. La tecnología de PCR es bien conocida en la técnica y se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como PCR: The Polymerasa Chain Reaction, Mullis y col., 1994, eds. (Birkauswer Press, Boston, MA).

25 Puede obtenerse ARN mediante el uso del ADN aislado en un vector

159
162

apropiado e inserción del mismo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe en ARN, el ARN puede aislarse después usando procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica como se expone en Sambrook y col., 1989, anteriormente, por ejemplo.

- 5 Pueden construirse vectores de clonación adecuados de acuerdo con técnicas convencionales o pueden seleccionarse a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende usar, los vectores de clonación útiles tendrán generalmente la capacidad de
- 10 autorreplicarse, pueden poseer una sola diana para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden llevar genes para un marcador que puede usarse en la selección de clones que contengan el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados mp18, mp19,
- 15 pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Están disponibles éstos y muchos otros vectores de clonación en casas comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

- Los vectores de expresión son generalmente construcciones polinucleotídicas replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la
- 20 invención. Se supone que un vector de expresión debe poder replicarse en las células huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, cósmidos y un vector o vectores de expresión
- 25 descritos en la Publicación PCT N° WO 87/04462. Los componentes de vector

pueden incluir generalmente, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control de la transcripción adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción) habitualmente también son necesarios uno o no más elementos de control de la traducción, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano y otras sustancias; bombardeo de microproyectiles, lipofección; e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso tal como un virus vaccinia). La selección de vectores o polinucleótidos de introducción dependerá con frecuencia de características de la célula huésped.

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en este documento. Puede usarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo para el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamíferos incluyen, pero sin limitación, células COS, HeLa, NSO y CHO. Véase también la Publicación PCT N° WO 87/04462. Las células huésped no mamíferas adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levaduras (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferiblemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel de aproximadamente 5 veces más, más

160
163

preferiblemente 10 veces más, aún más preferiblemente 20 veces más que el del anticuerpo o proteína endógenos de interés correspondientes, si están presentes en las células huésped. La exploración de células huésped para una unión específica a PCSK9 o a un dominio de PCSK9 se efectúa mediante un
5 inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

C. Composiciones

Las composiciones usadas en los procedimientos de la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de PCSK9, un
10 polipéptido obtenido de anticuerpo antagonista de PCSK9 u otros antagonistas de PCSK9 descritos en este documento. Los ejemplos de tales composiciones, así como cómo formularlas, también se describen en una sección anterior y más adelante. En una realización, la composición comprende además un antagonista de PCSK9. En otra realización, la composición comprende uno o
15 más anticuerpos antagonistas de PCSK9. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 reconoce PCSK9 humano. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 es humanizado. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 comprende una región constante que no desencadena una respuesta inmune indeseada o indeseable, tal como lisis
20 mediada por anticuerpo o ADCC. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 comprende una o más CDR del anticuerpo (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, seis CDR). En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de PCSK9 es humano.

Se aprecia que las composiciones pueden comprender más de un
25 anticuerpo antagonista de PCSK9 (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos

antagonistas de PCSK9 que reconoce diferentes epítomos de PCSK9). Otras composiciones ilustrativas comprenden más de un anticuerpo antagonista de PCSK9 que reconoce el mismo o los mismos epítomos o especies diferentes de anticuerpos antagonistas de PCSK9 que se unen a epítomos diferentes de PCSK9.

La composición usada en la presente invención puede comprender además vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed., 2000, Lippicott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para receptores en las dosis y concentraciones y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulina; polímeros hidrófilos tales como polivinil pirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o

161

polietilenglicol (PEG). En este documento se describen adicionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, el anticuerpo se administra en una formulación como una solución acuosa estéril que tiene un pH que varía de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y que comprende de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, de aproximadamente 1 milimolar a aproximadamente 100 milimolar de tampón de histidina, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, de aproximadamente 100 milimolar a aproximadamente 400 milimolar de trehalosa y de aproximadamente 0,01 milimolar a aproximadamente 1,0 milimolar de dihidrato de EDTA disódico.

El anticuerpo antagonista de PCSK9 y composiciones del mismo también se pueden usar junto con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de los agentes.

15 D. Kits

La invención también proporciona kits para uso en los presentes procedimientos. Los kits de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo antagonista de PCSK9 (tal como un anticuerpo humanizado) o péptido descrito en este documento e instrucciones para uso de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de la invención descritos en este documento. En general, estas instrucciones comprenden una descripción de administración del anticuerpo antagonista de PCSK9, péptido o aptámero para los tratamientos terapéuticos descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo es humano. En otras realizaciones, el

anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Las instrucciones que se refieren al uso de un anticuerpo antagonista de PCSK9 en general incluyen información con respecto a la dosificación, el programa de dosificación y la vía de administración del tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis
5 unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones en un disco de
10 almacenamiento magnético u óptico).

Los kits de esta invención están en envases adecuados. Los envases adecuados incluyen, pero sin limitación, viales, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas selladas Mylar o plásticas) y similares. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico,
15 tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un orificio de entrada estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un
20 orificio de entrada estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo antagonista de PCSK9. El recipiente (por ejemplo, jeringa o autoinyector precargado) puede comprender además un segundo agente
25 farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto o prospectos en o asociados con el recipiente.

5 Mutaciones y Modificaciones

Para expresar los anticuerpos de PCSK9 de la presente invención, en primer lugar se pueden obtener fragmentos de ADN que codifican regiones V_H y V_L usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. También se pueden introducir diversas modificaciones, por ejemplo, mutaciones, 10 supresiones y/o adiciones en las secuencias de ADN usando procedimientos convencionales conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar mutagénesis usando procedimientos convencionales, tales como mutagénesis mediada por PCR, en la que los nucleótidos mutados se incorporan en los cebadores de PCR de forma que el producto de PCR 15 contiene las mutaciones deseadas o mutagénesis dirigida.

Por ejemplo, un tipo de sustitución que se puede realizar es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que pueden ser químicamente reactivas, a otro resto tal como, sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede existir una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución se puede realizar en 20 una CDR o región marco conservada de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la cisteína es canónica.

Los anticuerpos también se pueden modificar, por ejemplo, en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se puede realizar una 25 mutación en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_D

del anticuerpo para PCSK9, para aumentar o disminuir la k_{off} o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. En el campo se conocen técnicas en mutagénesis dirigida. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. y Ausubel y col., anteriormente.

5 También se puede realizar una modificación o mutación en una región marco conservada o dominio constante para aumentar la semivida de un anticuerpo de PCSK9. Véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 00/09560. También se puede realizar una mutación en una región marco conservada o dominio constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para
10 proporcionar un sitio para unión covalente o no covalente a otra molécula o para alterar propiedades tales como fijación de complemento, unión de FcR y citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo. De acuerdo con la invención, un anticuerpo único puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las regiones CDR o marco conservadas del dominio variable o en el
15 dominio constante.

En un proceso conocido como “formación de línea germinal” (germlining), determinados aminoácidos en las secuencias V_H y V_L se pueden mutar para coincidir con las que se encuentran de forma natural en las secuencias V_H y V_L de línea germinal. En particular, la secuencia de
20 aminoácidos de las regiones marco conservadas en las secuencias V_H y V_L se pueden mutar para coincidir con las secuencias de línea germinal para reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra el anticuerpo. Las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de V_H y V_L humano se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencia de
25 línea germinal humana “Vbase”; véase también Kabat E. A., y col. (1991)

163
166

Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. N° 91-3242; Tomlinson y col., 1992, J. Mol. Biol. 227: 776-798 y Cox y col., 1994. Eur. J. Immunol. 24: 827-836).

- 5 Otro tipo de sustitución de aminoácidos que se puede realizar es retirar sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales sitios se pueden encontrar en una región CDR o marco conservada de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de restos de cisteína y la remoción de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de heterogenicidad en
- 10 el producto de anticuerpo y aumentar, de ese modo, su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido elimina pares asparagina-glicina, que forman sitios de desamidación potenciales, alterando uno o ambos restos. En otro ejemplo, se puede escindir la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo de PCSK9 de la invención. En diversas realizaciones de la
- 15 invención, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de PCSK9 pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

- Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L de la presente invención, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante
- 20 convencionales, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en genes de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un
- 25 enlazador flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en este

contexto, tiene por objeto referirse a que dos fragmentos de ADN están unidos de forma que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanece en fase.

El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que
5 codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). En la técnica se conocen las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanas (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col., 1991, *Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico*,
10 Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. N° 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG2.
15 La secuencia de región constante de IgG puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos que se conoce que aparecen entre individuos diferentes, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan sustitución de aminoácido de origen natural en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento de Fab, el ADN que codifica V_H se puede
20 unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante de cadena pesada CH1. La región constante de cadena pesada CH1 se puede obtener a partir de cualquiera de los genes de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab)
25 uniendo operativamente el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que

164
167

codifica la región constante de cadena ligera, C_L . Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humanas se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., y col., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publ. N° 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos que se conoce que aparecen entre individuos diferentes, tales como Inv(1), Inv(2) e Inv(3). La región constante lambda se puede obtener a partir de cualquiera de los tres genes lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, de manera que las secuencias V_H y V_L se pueden expresar como una proteína de cadena única contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird y col., 1988, *Science* 242: 423-426; Huston y col., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 5879-5883; McCafferty y col., 1990, *Nature* 348: 552-554). El anticuerpo de cadena única puede ser monovalente, si se usan sólo una V_H y V_L única, bivalente, si se usan dos V_H y V_L o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Se puede generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a PCSK9 y a otra molécula.

En otra realización, se puede preparar un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprenda todo o una parte de un anticuerpo de PCSK9 de la invención unido a otro polipéptido. En otra realización, sólo los dominios

variables del anticuerpo de PCSK9 se unen al polipéptido. En otra realización, el dominio V_H de un anticuerpo de PCSK9 se une a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo de PCSK9 se une a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido en una manera de forma
5 que los dominios V_H y V_L puedan interaccionar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otra realización preferida, el dominio V_H está separado del dominio V_L mediante un enlazador de forma que los dominios V_H y V_L pueden interaccionar entre sí. Después, el anticuerpo V_H -enlazador- V_L se une al polipéptido de interés. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los
10 que dos (o más) anticuerpos de cadena única están unidos entre sí. Esto es útil si se desea crear un anticuerpo bivalente o polivalente en una cadena polipeptídica única o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

En otras realizaciones, se pueden preparar otros anticuerpos modificados usando anticuerpo de PCSK9 que codifica moléculas de ácido
15 nucleico. Por ejemplo, se pueden preparar "cuerpos Kappa" (Ill y col., 1997, Protein Eng. 10: 949-57), "Minicuerpos" (Martin y col., 1994, EMBO J. 13: 5303-9), "Diacuerpos" (Hollinger y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448) o "Janusins" (Traunecker y col., 1991, EMBO J. 10: 3655-3659 y Traunecker y col., 1992, Int. J. Cancer (Supl.) 7: 51-52) usando técnicas de
20 biología molecular convencionales siguiendo los contenidos de la memoria descriptiva.

Se pueden producir anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno mediante una diversidad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab. Véase, por ejemplo, Songsivilai &
25 Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321, Kostelny y col., 1992, J.

165
168

Immunol. 148: 1547-1553. Además, se pueden formar anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" o "Janusins". En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se une a dos epítomos diferentes de PCSK9. En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados descritos anteriormente se preparan usando uno o más de los dominios variables o regiones CDR a partir de un anticuerpo de PCSK9 humano proporcionado en este documento.

Generación de anticuerpos específicos de antígeno

Se evaluaron más de 500 anticuerpos policlonales y monoclonales generados frente a PCSK9 humano de longitud completa recombinante, PCSK9 de ratón de longitud completa recombinante y diversos péptidos sintéticos para determinar su capacidad de regular negativamente la proteína LDLR total en células hepáticas humanas Huh7 cultivadas. Entre estos anticuerpos estaba un conjunto de anticuerpos generados para y reactivos con un conjunto de polipéptidos de 12-20 restos de aminoácidos que, basándose en la estructura de PCSK9, se pronosticaba que cubrían la mayor parte de la superficie de la proteína. En la concentración más alta, los mejores anticuerpos mostraron actividad bloqueante de sólo aproximadamente el 60%.

Por tanto, se empleó un enfoque alternativo e inexplorado hasta ahora, concretamente, la generación de anticuerpos monoclonales inmunizando ratones sin PCSK9 con proteína PCSK9 de longitud completa recombinante. Esta forma de preparación de anticuerpo produjo anticuerpos antagonistas que muestran bloqueo completo de unión de PCSK9 a LDLR, bloqueo completo de reducción de niveles de LDLR mediada por PCSK9 en células Huh7 y reducción de LDLc *in vivo* incluyendo en ratones hasta niveles comparables con los observados en ratones PCSK9 -/-, como se muestra en el Ejemplo 7.

Los anticuerpos representativos (hibridomas) de la presente invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el 28 de febrero de 2008 y se les asignaron los números de acceso de la Tabla 3. Se depositaron hibridomas para anticuerpos 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4.

5

Tabla 3

<u>Referencia de Anticuerpo</u>	<u>Nº de Acceso de ATCC</u>
4A5	PTA-8985
5A10	PTA-8986
6F6	PTA-8984
7D4	PTA-8983

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y Exploración de Anticuerpos Antagonistas de PCSK9.

10 Procedimientos generales para inmunización de animales para generar anticuerpos monoclonales:

A ratones balb/c o 129/bl6 pcsk9 -/- se inyectaron 5 veces en un programa de 13 días 100 µg de antígeno. PCSK9 -/- (es decir, ratones nulos o knock-out) se pueden obtener en o como se ha descrito por, Rashid y col.,
15 2005, Proc. Natl Acad Sci EE.UU. 102: 5374. Véase también la Patente de Estados Unidos Nº 7.300.754. Para las primeras 4 inyecciones, se preparó antígeno mezclando las proteínas recombinantes con adyuvante. El inmunógeno se proporcionó a través de inyección en la nuca, las almohadillas plantares y por vía intraperitoneal, aproximadamente cada 3 días durante el
20 transcurso de 11 días, con el último refuerzo administrado i.v., sin adyuvante. El día 13, los ratones se sometieron a eutanasia y se retiraron sus bazo. Los linfocitos se immortalizaron mediante fusión con una línea celular establecida

166
169

para preparar clones de hibridoma usando tecnología de hibridoma convencional, distribuidos en placas de 96 pocillos. Se permitió que los clones crecieran, después se seleccionaron mediante detección por ELISA usando el antígeno inmunizante, como más adelante.

5 Detección por ELISA de anticuerpos:

- Se exploraron medios de sobrenadante de clones de hibridoma en desarrollo por separado para determinar su capacidad de unir al PCSK9 humano recombinante o PCSK9 de ratón recombinante. Los ensayos se realizaron con placas de 96 pocillos revestidas durante una noche con 100 μ l de una solución de 1 μ g/ml de uno de los antígenos. El exceso de reactivos se lavó de los pocillos entre cada etapa con PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Después las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 0,5%. Se añadió sobrenadante a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. Se añadió anti-Fc de ratón de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) para unir los anticuerpos de ratón unidos al antígeno. Después se añadió tetrametil bencidina como sustrato para HRP para detectar la cantidad de anticuerpo de ratón presente en el sobrenadante. La reacción se detuvo y la cantidad relativa de anticuerpo se cuantificó leyendo la absorbancia a 450 nm. Se seleccionaron clones de hibridoma que secretaban anticuerpos que son capaces de unirse a PCSK9 de ratón o humano para análisis adicional.

Regulación por disminución de LDLR mediada por PCSK9 en células Huh7:

- Se expandieron clones de hibridoma que secretaban anticuerpos de unión de PCSK9 humano o de ratón y se recogieron los sobrenadantes. Las IgG totales se purificaron a partir de aproximadamente 10 ml del sobrenadante

usando perlas de proteína A, se dializaron en tampón de PBS y el volumen final se redujo para producir soluciones con 0,7-1 mg/ml de anticuerpos. Los anticuerpos purificados después se usaron para ensayar su capacidad de inhibir la capacidad de PCSK9 de mediar la regulación por disminución de

5 LDLR en células Huh7. Células Huh7 se sembraron y se permitió que crecieran hasta confluencia del 80% den medio RPMI que contenía FBS al 10%, glutamina 4 mM y penicilina y estreptavidina en placas de 96 pocillos. El medio se cambió a uno que contenía FBS sin lípidos al 10% durante 8-16 h para inducir expresión de LDLR. Después las células se incubaron durante 8-16

10 horas con 40 µl/pocillo de medio de expresión de 293 complementado con 6 µg/ml de PCSK9 humano (preferiblemente) o de ratón, con o sin 70-100 µg/ml de anticuerpos de ensayo. Los medios que contenían PCSK9 y anticuerpo se retiraron al final de la incubación y las células se lisaron con 17 µl de tampón de lisis mediante agitación a 4°C durante una hora. El tampón de lisis estaba

15 constituido por glicerol fosfato 50 mM, HEPES 10 mM pH 7,4, Triton X-100 al 1%, NaCl 20 mM y un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche). Los lisados celulares se recogieron y se analizaron para determinar niveles de proteína LDLR a través de tinción de transferencias de Western a continuación de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. Los clones de hibridoma que

20 producen anticuerpos que pueden recuperar parcialmente o totalmente el nivel de LDLR se seleccionaron para análisis adicional. "Ensayo de regulación por disminución de LDLR" se refiere al ensayo anterior usando células Huh7.

La Figura 1 ilustra el efecto de anticuerpos monoclonales antagonistas anti-PCSK9 7D4.4, 4A5.G3, 6F6.G10.3 y 5A10.B8 sobre la capacidad de

25 PCSK9 humano y de ratón de regular negativamente LDLR en células Huh7

167
120

cultivadas. Se usó PCSK9 recombinante de ratón o humano 100 nM y una dilución en serie de anticuerpos de 25-800 nM. A) PCSK9 de ratón. B) PCSK9 humano. Las figuras son transferencias de Western que muestran que los anticuerpos son en general más eficaces para bloquear la función de PCSK9 humano que PCSK9 de ratón. En general, los diversos anticuerpos tienen afinidades similares por PCSK9 humano pero varían en su afinidad por PCSK9 murino.

Ejemplo 2: Determinación de Afinidad de Unión a Anticuerpo

Las afinidades de anticuerpos de PCSK9 por PCSK9 se midieron en un biosensor Biacore 3000 de resonancia de plasmón superficial equipado con una microplaca sensora de calidad de investigación usando tampón de corrida HBS-EP (Biacore AB, Uppsala, Suecia - ahora GE Healthcare). Anti-IgG de Ms policlonal de conejo se acoplaron a amina en niveles saturantes en la microplaca usando una química convencional de *N*-hidroxisuccinimida/etildimetilaminopropil carbodiimida (NHS/EDC). El tampón se cambió a HBS-EP + 1 mg/ml de BSA + 1 mg/ml de CM-dextrano. IgG de PCSK9 de longitud completa se diluyeron hasta aproximadamente 15 µg/ml y se capturaron durante 1 minuto a 5 µl/min para dar niveles de aproximadamente 500 RU por celda de flujo, dejando un blanco para que sirva como un canal de referencia. Se inyectaron hPCSK9 3,73-302 nM o mPCSK9 2,54-206 nM como unas series de 3 veces de 5 miembros durante 1 minuto a 100 µl/min. La disociación se supervisó durante 5 min. La microplaca se regeneró después de la última inyección de cada valoración con dos impulsos de 30 s de ácido fosfórico 100 mM. Los ciclos de tampón proporcionaron blancos para dotar de referencias dobles los datos, que después se ajustaron

globalmente a un modelo de unión sencillo usando software Biaevaluation v.4.1. Las afinidades se dedujeron a partir del cociente de las constantes de tasa cinética ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Los resultados del Ejemplo 2 se muestran en la Tabla 4. Estos datos muestran que los anticuerpos tienen afinidad excelente por PCSK9 murino o PCSK9 humano, como se ha indicado.

Tabla 4

<u>mAb</u>	<u>ligando</u>	<u>Inhibición de unión</u> <u>de LDLR-PCSK9</u> <u>(CI₅₀)</u>	<u>K_{on} para</u> <u>PCSK9</u> <u>(1/Ms)</u>	<u>K_{off} para</u> <u>PCSK9</u> <u>(1/S)</u>	<u>K_D para</u> <u>PCSK9</u> <u>(nM)</u>
4A5	humano	0,4 nM	6,66 x 10 ⁻⁴	1,89 x 10 ⁻⁴	2,8
5A10	humano	0,4 nM	8,47 x 10 ⁻⁴	8,55 x 10 ⁻³	1
6F6	humano	1,5 nM	9,15 x 10 ⁻⁴	5,84 x 10 ⁻⁴	6,4
7D4	humano	1,5 nM	1,25 x 10 ⁻³	7,94 x 10 ⁻⁴	6,4
4A5	ratón	3 nM	1,41 x 10 ⁻³	7,2 x 10 ⁻⁴	5,1
5A10	ratón	3 nM	1,27 x 10 ⁻³	4,89 x 10 ⁻⁴	3,9
6F6	ratón	10 nM	1,11 x 10 ⁻³	1,97 x 10 ⁻³	17,7
7D4	ratón	1 nM	3,92 x 10 ⁻⁴	5,23 x 10 ⁻⁴	1,3

Ejemplo 3: Análisis del Efecto de Anticuerpos de PCSK9 sobre interacción PCSK9-LDLR

La PCSK9 ha demostrado que se une a LDLR con una afinidad de 180 nM en pH neutro (Cunningham y col., 2007, Nat Struct Mol Biol., 145(5): 413-9). Se biotiniló proteína PCSK9 de ratón o humana recombinante usando los reactivos de Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante. Placas de ELISA (Corning Mixisorb) se revistieron con una solución de 1 µg/ml de dominio extracelular de LDLR recombinante (R&D Systems) en cada pocillo a 4°C durante una noche, se bloquearon con BSA al 2% + PBS durante 2 h a temperatura ambiente y después se lavaron 5 veces con tampón de lavado

171 168

(PBS 1x + Tween-20 al 0,05%). Los pocillos se incubaron con 50 μ l de concentraciones indicadas de proteína PCSK9 biotinilada durante 1 h TA. La unión de LDLR-PCSK9 se puede estabilizar añadiendo 50 μ l de FDH al 4% + sacarosa al 4% + solución de PBS e incubando durante 5 minutos. Los pocillos se lavaron 5 veces con tampón de lavado, se incubaron con dilución 1:2000 de estreptavidina conjugada a HRP (Invitrogen) durante 1 h a TA y se lavaron 5 veces con tampón de lavado. Se añadió sustrato TMB a los pocillos, la solución se incubó 20 a 30 min a TA y la reacción se terminó usando ácido fosfórico 1 M. Las señales se leyeron a 450 nm.

10 La Figura 2 ilustra la dosis-respuesta de anticuerpos monoclonales antagonistas anti-PCSK9 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3, 5A10.B8, anticuerpo de control negativo 42H7 y PBS para bloquear la unión de PCSK9 humano y PCSK9 de ratón biotinilado recombinante a dominio extracelular de LDLR recombinante inmovilizado *in vitro*. La parte A) muestra unión de PCSK9 humano a dominio extracelular de LDLR humano y que 7D4, 4A5, 5A10 y 6F6 son eficaces para bloquear la unión, mientras que 42H7 y PBS no lo son. La parte B) muestra la unión de PCSK9 de ratón a dominio extracelular de LDLR humano.

La interacción también se puede evaluar en solución libre a pH neutro.

20 La Figura 3 ilustra la dosis-respuesta de anticuerpos monoclonales antagonistas anti-PCSK9 6F6.G10.3, 7D4.4, 4A5.G3 y 5A10.B8 para bloquear la unión de PCSK9 humano biotinilado recombinante (30 nM) a dominio extracelular de LDLR recombinante marcado con Europio (10 nM) en solución a pH neutro *in vitro*. Este ensayo mide la unión en solución libre a pH neutro.

25 Ejemplo 4: Cartografía de Epítipo/Unión de Anticuerpos usando la Estructura

Cristalina del Complejo de L1L3:PCSK9, Biacore y Mutagénesis

a. Estructura cristalina del complejo de L1L3:PCSK9. Los restos se identificaron calculando la diferencia en el área superficial accesible entre la estructura cristalina de L1L3:PCSK9 y la estructura de PCSK9 solo. Los restos de PCSK9 que muestran área superficial oculta tras la formación de complejo con anticuerpo L1L3 se incluyeron como una parte del epítopo. La superficie accesible a disolvente de una proteína se definió como el locus del centro de una esfera de sonda (que representa una molécula de disolvente de 1,4 Å de radio) a medida que se enrolla sobre la superficie de Van der Waals de la proteína. El área superficial accesible al disolvente se calculó generando puntos de superficie sobre una esfera extendida alrededor de cada átomo (a una distancia del centro del átomo igual a la suma de los radios del átomo y la sonda) y eliminando los que recaen dentro de esferas equivalentes asociadas con átomos vecinos como se implementa en el programa AREAIMOL (Briggs. P. J., 200, CCP4 Newsletter N° 38, CCÑRC, Daresbury).

El resultado del análisis de la estructura cristalina se muestra en la Figura 23. La Figura 23A muestra la estructura cristalina del PCSK9 (representación de superficie gris clara) unida al anticuerpo L1L3 (representación de dibujo negro). El epítopo para unión de L1L3 a PCSK9 implica los restos 153-155, 194, 197, 237-239, 367, 369, 374-379 y 381 de la secuencia de aminoácidos de PCSK9 (SEC ID N°: 53). En comparación, el epítopo para la unión del dominio EGF de LDLR a PCSK9 implica los restos 153-155, 194, 238, 367, 369, 372, 374-375 y 377-381 (Kwon y col., 2008, PNAS 105: 1820-1825).

b. Anticuerpos y epítomos de grupo basándose en competición en unión

169
172

a PCSK9. IgG de longitud completa se acoplaron a amina a una microplaca sensora de CM5 (tres por microplaca a aproximadamente 7000 RU finales), usando una química de acoplamiento a amina mediada por EDC/NHS convencional. Una celda de flujo se dejó sin modificar para proporcionar un canal de referencia. PCSK9 humano (100 nM) se pre-mezcló con una serie de IgG (500 nM final) y estos complejos se inyectaron sobre la microplaca usando inyecciones de 1 min a 10 μ l/min. Los anticuerpos que se unen a epítomos competidores bloquearán la unión de PCSK9 al anticuerpo inmovilizado sobre la microplaca. Como alternativa, se usó un enfoque de sándwich clásico inyectando en primer lugar PCSK9 humano a 50 nM durante 1 min a 10 μ l/min (para atarlo a través de la IgG a la microplaca) y después uniendo una serie de IgG (500 nM final cada una) durante 2 min cada una. Las IgG inmovilizadas se regeneraron con un ácido suave (tampón de elución suave Pierce + NaCl 1 M). Se usaron anticuerpos dirigidos hacia diferentes epítomos conocidos como controles para formación de sándwich positivo en este ensayo.

c. Mutagénesis guiada por estructura para cartografiar epítomos de unión a anticuerpo. Basándose en la estructura cristalina del PCSK9 y la participación probable de D374 en la unión a LDLR (Cunningham y col., 2007, Nat Struct Mol Biol., 14(5): 413-419), se eligieron para mutación diecinueve mutantes de resto de superficie de PCSK9 (F379A, I369A, R194A, D374Y, D238R, T377R, K222A, R199A, F216A, R218A, R237A, D192R, D367R, R165A, R167A, A443T, A53V, I474V, H449A) cerca o lejos de la posición de D374 para cartografiar los epítomos de unión a anticuerpo.

d. Producción de mutante y anticuerpo. Los 19 mutantes de punto único se generaron a partir de la construcción de ADN de tipo natural descrita

previamente (Cunningham y col., 2007, anteriormente) usando técnicas de ADN convencionales. Las proteínas mutantes se expresaron usando transfección transitoria en células HEK293T y se secretaron en el medio celular. Las proteínas mutantes se purificaron con el sistema de alto
5 rendimiento AKTA Xpress (GE Healthcare) mediante etapas de cromatografía de Ni²⁺ y por exclusión de tamaño, usando condiciones similares a las que se han descrito previamente. Las concentraciones de proteína se determinaron usando el instrumento LabChip (Bio-Rad). Los anticuerpos murinos bloqueantes de PCSK9 4A5, 7D4, 5A10 y 6F6 se expresaron con transfección
10 transitoria en células HEK293F y se purificaron con una columna de proteína G eluida con tampón de Glicina 0,1 M a pH 2,8 y se neutralizaron en Tris 1,0 M a pH 9,0.

e. Las regiones de PCSK9 que se ponen en contacto con anticuerpos monoclonales 5A10 y 7D4 (preparación descrita más adelante en este
15 documento) se determinaron mediante tomografía de proteína (Sidec AB, Estocolmo, Suecia). Los bucles en las posiciones 186-200, 371-379, 176-181, 278-283, 449-453, 402-406 y 236-245 de PCSK9 eran proximales a los restos de aminoácidos del anticuerpo. Las secuencias correspondientes a los bucles se muestran en la Tabla 5 y en una realización preferida, los antagonistas de la
20 invención se unen a una o más de estas secuencias en PCSK9.

Tabla 5

Bucles de PCSK9	Secuencia	SEC ID N°
186-200	DTSIQSDHREIEGRV	1
236-245	GRDAGVAKGA	2
371-379	ASSDCSTCF	3

173
140

176-181	GGSLVE	4
278-283	QPVGPL	5
449-453	HGAGW	6
402-406	AEPEL	7

f. Unión en Biacore de los mutantes a LDLR inmovilizado. Proteína de dominio extracelular LDLR recombinante se inmovilizó sobre una microplaca de Biacore SA. Cada proteína mutante se inyectó al Biacore-3000 M) por duplicado a 25 mM a 0,012 mM en cinco concentraciones (de 1°C, con un tampón de corrida de Tris 50 mM pH 7,5, CaCl₂ 2 mM, NaCl 200 mM, P20 al 0,02% y 1 mg/ml de BSA). Todos los resultados se ajustan bien a un modelo de cinética de unión 1:1. Como se esperaba, la mutación en los restos en contacto directo con el dominio de EGF-A (F379A, R194A, I369A, T377R, D238R) debilita significativamente (en 10-100 veces) la unión a LDLR. Además, tres mutantes que no están en contacto con EFG-A (R199A, R218A, K222A) mostraron unión más débil (de 5-15 veces). Este nuevo hallazgo sugiere que los mismos están implicados en la unión de otros dominios de LDLR. En conjunto, estos experimentos dan validez a la integridad y actividad de los mutantes para experimentos de cartografía de epítipo posteriores.

g. Unión de los mutantes a anticuerpos 4A5, 7D4, 5A10 y 6F6 inmovilizados. Anticuerpos anti-PCSK9 biotinilados se inmovilizaron sobre microplacas de SA usando procedimientos convencionales. Se realizaron experimentos de unión de mutante usando Biacore 3000 a 25°C con un tampón de corrida de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y P20 al 0,02%. Los mutantes se ensayaron a concentraciones de 333 nM o 111 nM por duplicado, comparando los que dan unión debilitada con el tipo natural como los restos

implicados en unión a mAb (enumerados más adelante).

mAb	Restos de Unión en Orden Descendente de Efectos de Mutante
4A5	R237, F379, 369, R194, R199 & D238
5A10	R194, R237, I369, D238, R199
6F6	R237, R194, F379, D238, I369, T377, R199
7D4	R237, R194, F379, I369, R199

Ejemplo 5: Clonación y secuenciación de Anticuerpos.

Un millón de células de hibridoma se homogeneizaron usando las
5 columnas spin QIAshredder y se extrajo ARN total de acuerdo con el kit
RNAeasy Micro de QIAGEN. Se sintetizó ADNc usando el kit SuperScript III RT
de Invitrogen. Las regiones variables de los anticuerpos de PCSK9 se clonaron
usando los Conjuntos de Cebador de IgG de ratón de Novagen, que están
constituidos por cebadores degenerados para clonar genes de cadena pesada
10 de IgG de ratón y las cadenas ligeras kappa o lambda de ratón. Las
condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes; un ciclo a 92°C durante 2
min; dos ciclos a 94°C durante 30 s, 44°C durante 30 s y 72°C durante 2 min;
dos ciclos a 94°C durante 30 s, 46°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; dos
ciclos a 94°C durante 30 s, 48°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; dos ciclos
15 a 94°C durante 30 s, 50°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; dos ciclos a 94°C
durante 30 s, 52°C durante 30 s y 72°C durante 2 min; seguido por 35 ciclos a
94°C durante 30 s, 54°C durante 30 s y 72°C durante 45 s. Los productos de
PCR resultantes se clonaron en vector de clonación Topo-TA de Invitrogen y se
secuenciaron. Las secuencias de anticuerpo clonadas se confirmaron mediante
20 secuenciación *N*-terminal de los primeros 10 aminoácidos de los anticuerpos
originales producidos a partir de líquido ascítico.

Ejemplo 6: Generación de Antígenos para Inmunización

174
174

Se produjo proteína PCSK9 humana recombinante como se ha indicado en Cunningham y col., 2007, Nat Struct Mol Biol., 145(5): 413-9. Para producir proteína PCSK9 de ratón recombinante, el ADNc de PCSK9 de ratón se clonó en vector de expresión de mamífero PRK5 con la adición de un marcador 6-His en el extremo C mediante procedimientos conocidos en la técnica, se transfectó transitoriamente y se expresó en células HEK293. Se purificó proteína recombinante a partir de medios acondicionados usando una columna de Ni.

Los péptidos de superficie de PCSK9 humano y de ratón se seleccionaron basándose en la estructura de proteína de PCSK9 y se sintetizaron por Elim. Biopharmaceuticals.

Ejemplo 7: Anticuerpos Específicos de PCSK9 como Antagonistas de PCSK9

1. Identificación de anticuerpos antagonistas específicos de PCSK9

a. Identificación de anticuerpos bloqueantes de PCSK9

Se generaron anticuerpos murinos para PCSK9 humano y/o de ratón inmunizando ratones con péptidos sintéticos de PCSK9 humano y de PCSK9 de ratón como se prepararon en el Ejemplo 6 o proteínas recombinantes y explorando anticuerpos mediante ensayo de ELISA usando proteína recombinante PCSK9 humana y/o de ratón como el antígeno como se ha descrito en el Ejemplo 1 y otros procedimientos de hibridoma convencionales. Se obtuvieron más de 500 clones positivos y se permitió que crecieran hasta confluencia en placas de 6 pocillos con 10 ml de medio. El sobrenadante de medio se recogió y se purificaron las IgG totales en el medio acondicionado usando mAn Select (Pierce). La capacidad de IgG de ratón purificadas y concentradas para inhibir la función de PCSK9 de ratón y humano se ensayó

en células Huh7 usando los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Clones de hibridoma que expresaban IgG que mostraban algún grado de bloqueo se expandieron y reensayaron. 60 clones prometedores se subclonaron, se expandieron y se inyectaron en ratones Balb/c o desnudos para producir líquido ascítico. Los anticuerpos purificados a partir del líquido ascítico se reensayaron para determinar su capacidad de inhibir la regulación por disminución de LDLR mediante PCSK9 humano o de ratón en células Huh7. Cuatro clones de hibridoma, 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4, se identificaron como que eran capaces de inhibir completamente la función de PCSK9 humano y, al menos parcialmente, inhibir la función de PCSK9 de ratón. Para determinar la CI_{50} de cada uno de estos anticuerpos bloqueantes, se usó una dilución seriada de IgG en el ensayo, comenzando desde 100 $\mu\text{g/ml}$ hasta 3,125 $\mu\text{g/ml}$, siendo la concentración de PCSK9 humano y de ratón constante a 6 $\mu\text{g/ml}$.

b. Efecto de antagonista de PCSK9 sobre unión de PCSK9-LDLR

La PCSK9 ha demostrado estar co-localizada con LDLR en compartimientos celulares (Lagace y col., 2006, J Clin Inv, 116(11): 2995-3005). La proteína PCSK9 recombinante también se une al dominio extracelular de LDLR *in vitro* (Fisher y col., 2007, JBC, 282(28): 20502-12). Para determinar la relación entre la inhibición de regulación por disminución mediada por PCSK9 de LDLR y la inhibición de unión de PCSK9-LDLR por anticuerpos, se ensayaron los anticuerpos de PCSK9 que bloqueaban parcialmente o completamente la función de PCSK9 sobre LDLR y representantes de anticuerpos que no la bloqueaban. Todos los anticuerpos antagonistas parciales también inhibieron parcialmente la unión del dominio extracelular de LDLR a PCSK9, excepto uno. Los anticuerpos antagonistas que

172
175

pueden bloquear completamente la función de PCSK9, concretamente 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 también inhibieron completamente la unión de dominio extracelular de LDLR a PCSK9 (Tabla 5). Los valores de CI_{50} de estos cuatro anticuerpos están correlacionados con su afinidad de unión hacia PCSK9.

5 c. Determinación de epítipo de los anticuerpos bloqueantes.

La Figura 4 ilustra la unión de epítipo de anticuerpos anti-PCSK9. La parte A) muestra información de epítipo de mAb anti-PCSK9, determinada por la unión a péptidos de 13-18 unidades sintéticos o unión a epítipo a través de Biacore. La parte B) muestra la capacidad de anticuerpos inmovilizados 6F6, 5A10 y 4A5 de unirse a PCSK9 humano pre-mezclado con los mAb indicados en el eje y, mediante ensayo de Biacore.

Otro anticuerpo anti-PCSK9 monoclonal, denominado 6G7, se une a PCSK9 de ratón recombinante pero no a PCSK9 humano. Véase la Tabla 6. 6G7, 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 excluyen mutuamente la unión de cada uno a PCSK9 de ratón. El análisis de quimera entre PCSK9 de ratón y humano revela que la unión de 6G7 a PCSK9 requiere el dominio catalítico. Véase la Tabla 6. Por tanto, los sitios de unión de 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 solapan el sitio catalítico y/o el epítipo unido por 6G7.

Tabla 6

Proteína recombinante	Unión de 6G7
PCSK9 humano	No
Pro humano + catalítico humano + C-term de ratón	No
Pro humano + catalítico de ratón + C-term de ratón	Sí
Pro de ratón + catalítico humano + C-term humano	No
Pro de ratón + catalítico de ratón + C-term humano	Sí
PCSK9 de ratón	Sí

d. Determinación de especificidad de especies de secuencias de anticuerpos anti-PCSK9.

Para determinar la especificidad de especies de los anticuerpos anti-PCSK9, se incubaron anticuerpos con plasma de diferentes especies y los complejos resultantes se purificaron y sondearon mediante un anticuerpo anti-PCSK9 independiente en transferencias de Western. Los anticuerpos 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 reconocieron PCSK9 humano, de mono cynomolgus, de ratón y de rata. Véase la Figura 5. El anticuerpo 6G7 sólo reconoció PCSK9 murino y un anticuerpo de control no relacionado 42H7 no reconoció ningún PCSK9 ensayado. Igualmente.

e. Determinación de secuencias de anticuerpos antagonistas de PCSK9.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de anticuerpos de PCSK9 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 se determinaron usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 5. Las secuencias indican que los anticuerpos están relacionados pero son diferentes entre sí. La Tabla 1 muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cada anticuerpo. La Tabla 7 muestra las secuencias CDR de las cadenas ligeras y cadenas pesadas de la Tabla 1 según se han identificado mediante los métodos de Kabat y Chotia.

20 Tabla 7. Anticuerpos Bloqueantes de PCSK9 y Secuencias CDR de Unión a Antígeno de acuerdo con Kabat (subrayado) y Chotia (negrita)

	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
4A5	<u>KASQNVGTNVA</u> (SEC ID N°: 27)	<u>SASYRYS</u> (SEC ID N°: 28)	<u>QQFYSPYT</u> (SEC ID N°: 29)
5A10	<u>KASQDVSTAVA</u> (SEC ID N°: 30)	<u>SASYRYT</u> (SEC ID N°: 12)	<u>QQRYSTPRT</u> (SEC ID N°: 31)

173
p6

6F6	<u>SASQGISNYLN</u> (SEC ID N°: 32)	<u>YTSSLHS</u> (SEC ID N°: 33)	<u>QQYSKLPFT</u> (SEC ID N°: 55)
7D4	<u>KASQDVSNALA</u> (SEC ID N°: 34)	<u>SASYRYT</u> (SEC ID N°: 12)	<u>QQHYSTPWT</u> (SEC ID N°: 35)
L1L3	<u>RASQGISSALA</u> (SEC ID N°: 11)	<u>SASYRYT</u> (SEC ID N°: 12)	<u>QQRYSLWRT</u> (SEC ID N°: 13)

	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
4A5	<u>GYTFTDYYMN</u> (SEC ID N°: 56 (entera), <u>36</u> y <u>37</u>)	<u>DINPNNGGTTYNQKFKG</u> (SEC ID N°: <u>38</u> Y <u>39</u>)	<u>WLLFAY</u> (SEC ID N°: 40)
5A10	<u>GYTFTSYWMH</u> (SEC ID N°: 57 (entera), <u>41</u> y <u>42</u>)	<u>EINPSNGRTNYNEKFKS</u> (SEC ID N°: <u>43</u> Y <u>44</u>)	<u>ERPLYAMDY</u> (SEC ID N°: 45)
6F6	<u>GYTFTDYYMN</u> (SEC ID N°: 56 (entera), <u>36</u> y <u>37</u>)	<u>DINPNNGGTSYNQKFKG</u> (SEC ID N°: <u>38</u> Y <u>46</u>)	<u>GGIYYRYDRNYFDY</u> (SEC ID N°: 47)
7D4	<u>GFTFSDYYMA</u> (SEC ID N°: 58 (entera), <u>48</u> y <u>49</u>)	<u>NINYDGSNTSYLDSLKS</u> (SEC ID N°: <u>50</u> Y <u>51</u>)	<u>EKFAAMDY</u> (SEC ID N°: 52)
L1L3	<u>GYTFTSYYMH</u> (SEC ID,N°: 59 (entera), <u>60</u> y <u>8.</u>)	<u>EISPFGGRTNYNEKFKS</u> (SEC ID N°: <u>9</u> y <u>61</u>)	<u>ERPLYASDL</u> (SEC ID N°: 10)

Los anti-IgG de PCSK9 4A5, 5A10 y 6F6 se acoplaron mediante amina a la microplaca Biacore. hPCSK9 (100 nM) se mezcló con 4A5, 5A10, 6F6 o 7D4 500 nM en diversas proporciones y se inyectó durante 1 min a 10 µl/min. Los cuatro anticuerpos se bloquearon mutuamente entre sí independientemente de la orientación del ensayo ensayada, sugiriendo que todos ellos se unen a epítomos competidores. Por el contrario, son capaces de formar complejos de sándwich con otros anticuerpos no completamente bloqueantes que se

cartografiaron a regiones específicas usando péptidos sintéticos.

2. Efecto de anticuerpos específicos de PCSK9 como antagonistas de PCSK9 *in vivo*.

- a. Los anticuerpos antagonistas de PCSK9 reducen el colesterol en suero en
5 ratones.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales antagonistas de PCSK9 pueden influir sobre los niveles de colesterol *in vivo* inhibiendo la función de PCSK9 extracelular, se ensayó el efecto de 7D4 frente a PCSK9 de ratón *in vitro*, sobre colesterol en suero cuando se inyectaba a ratones.

- 10 Ratones C57/bl6 macho de 6 a 7 semanas de edad se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, se tomaron muestras de sangre para recoger aproximadamente 700 μ l de suero el día -7. El anticuerpo antagonista de PCSK9 7D4 y un anticuerpo monoclonal correspondiente de isotipo de control se inyectaron en ratones C57/bl6 de 7 semanas de edad macho a través de
15 inyecciones i.p. los días 0, 1, 2 y 3. Los ratones se sacrificaron el día 4 sin ayunas y se recogieron muestras de suero. Todas las muestras de suero congeladas se enviaron a laboratorios IDEXX para mediciones de colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL. La Figura 6 muestra que 7D4 redujo el colesterol en suero en el 48%, mientras que el anticuerpo de
20 control no tuvo ningún efecto significativo. Tanto la cantidad como el porcentaje de reducción son similares a lo que se indicó para ratones PCSK9 -/- (ratones knock-out de PCSK9), sugiriendo que se puede conseguir inhibición completa o casi completa de función de PCSK9 a través del bloqueo de PCSK9 extracelular sólo y que el PCSK9 intracelular juega un papel pequeño o no
25 juega ningún papel en la regulación por disminución de LDLR en condiciones

197

fisiológicas normales. Como se esperaba, los niveles de LDLR en hígado se indujeron en animales tratados con 7D4 en comparación con los que se trataron con un anticuerpo de control (Figura 6).

- b. Un anticuerpo parcialmente bloqueante no tuvo efecto sobre los niveles de colesterol en sangre.

La Figura 7 ilustra que un mAb anti-PCSK9 policlonal antagonista parcial CRN6 no influye sobre los niveles de colesterol en ratones. Se tomaron muestras de sangre a dos grupos de ratones C57/bl6 de 8 semanas de edad (n=10 ratones/grupo) y se ensayaron para determinar los niveles de colesterol el día -7; se dosificaron con 15 mg/kg/día de CRN6 o un anticuerpo de control mediante administración i.v. los días 0, 1, 2 y 3; y después se tomaron muestras de sangre y se ensayaron para determinar niveles de colesterol 24 h después de la dosis final. La Figura 7A muestra que el anticuerpo CRN6 bloquea parcialmente la regulación por disminución mediada por PCSK9 de LDLR en células Huh7 *in vitro*. La Figura 7B muestra que la administración de anticuerpo CRN6 no influye sobre los niveles de colesterol en suero en ratones.

c. Efecto prolongado sobre el colesterol en suero por mAb antagonista de PCSK9 en ratones.

Se realizó un estudio de evolución temporal para determinar el momento de la aparición y la duración del efecto reductor de colesterol de anticuerpos antagonistas de PCSK9 en ratones. Se inyectaron mAb 7D4 o solución salina de control i.v. a 10 mg/kg o 3 ml/kg en 48 ratones C57/bl6 de 6 semanas de edad. Se sacrificaron ocho ratones de cada grupo de tratamiento los días 1, 2, 4, 7, 14 y 21 después de la inyección. Una inyección única de 7D4 produjo un efecto reductor rápido y prolongado sobre el colesterol en suero. Se observó

una reducción del 25% en colesterol en suero 24 h después de la inyección. Véase la Figura 8. La máxima caída de colesterol en suero se observó en el punto de tiempo del día 7. A los 21 días, la reducción en colesterol ya no es estadísticamente significativa. La parte B) muestra colesterol HDL. Los niveles de colesterol LDL fueron muy bajos.

La Figura 9 ilustra que la dosis del mAb antagonista anti-PCSK9 7D4 reduce de forma dependiente el colesterol total, HDL y LDL en suero en ratones. Se tomaron muestras de sangre a seis grupos de ratones de C57/bl6 de 8 semanas de edad (n= 8/grupo) y se ensayaron para determinar niveles de colesterol basales el día -7 y se les administraron las dosis indicadas de anticuerpos o solución salina los días 0, 1, 2 y 3 mediante inyección de bolo i.p.. Se recogieron y se ensayaron muestras de suero para determinar niveles de colesterol 24 h después de la última dosis. La Figura 9A muestra los niveles de colesterol total, que disminuyeron hasta menos del 60% de control después de la administración de 3 a 30 mg/kg/día. El efecto máximo sobre el colesterol total se observó a 10 mg/kg y la reducción estadísticamente significativa a 1 mg/kg. La Figura 9B muestra los niveles de HDL, que disminuyeron hasta menos del 70% después de la administración de 3 a 30 mg/kg/día. La Figura 9C muestra niveles de LDL, que disminuyeron hasta casi cero en todas las dosis ensayadas de 0,3 mg/kg/día y superiores.

d. Respuesta a dosis de anticuerpos antagonistas específicos para PCSK9 en ratones.

La Figura 10 ilustra que el anticuerpo antagonista anti-PCSK9 5A10 reduce dependientemente de la dosis los niveles de colesterol en ratones. La Figura 10A muestra seis grupos de ratones C57/bl6 de 8 semanas de edad (n=

178

8/grupo) a los cuales se administraron las dosis indicadas de anticuerpos o solución salina diariamente los días 0, 1, 2 y 3 mediante inyección rápida i.v.. Se recogieron muestras de suero y se ensayaron para determinar los niveles de colesterol 24 h después de la última dosis y mostraron una disminución escalonada con dosis creciente de anticuerpo. La Figura 10B muestra cinco grupos de ratones C57/bl6 de 8 semanas de edad (n=8/grupo) a los cuales se administraron las dosis indicadas de anticuerpos o solución salina el día 0 mediante inyección i.p. en embolada. Se recogieron muestras de suero y se ensayaron para determinar niveles de colesterol el día 7 y también mostraron una disminución escalonada con dosis crecientes de anticuerpo.

La Figura 11 ilustra que los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 4A5 y 6F6 reducen los niveles de colesterol en ratones de una manera dependiente de dosis. A ratones C57/bl6 de ocho semanas de edad (n=8/grupo) se administraron las dosis indicadas de anticuerpos o solución salina el día 0 mediante inyección i.p. en embolada. Se recogieron muestras de suero y se ensayaron para determinar niveles de colesterol el día 7. En la Figura 11A, el anticuerpo 4A5 mostró una disminución escalonada en colesterol en suero total con dosis creciente de anticuerpo. En la Figura 11B, el anticuerpo 6F6 mostró disminución en colesterol en suero total a 10 mg/kg/día.

Los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 aumentan los niveles de LDLR en hígado en ratones como se observó mediante análisis de transferencia de Western. Véase la Figura 12. Para 4A5, 5A10 y 6F6, a ratones C57/bl6 de 8 semanas de edad se administraron 10 mg/kg de anticuerpos o solución salina el día 0 mediante inyección rápida i.v., los animales se sacrificaron el día 7 y se analizó el lisado de hígado completo

de 3 animales individuales para determinar niveles de proteína LDLR y GAPDH mediante Western. Para 7D4, se administraron a ratones BL6/c57 de 8 semanas de edad 10 mg/kg de anticuerpos los días 0, 1, 2 y 3 a través de inyección i.p. en embolada, los animales se sacrificaron el día 4 y el lisado de
 5 hígado completo de 3 animales individuales se analizó para determinar niveles de proteína LDLR y GAPDH mediante transferencia de Western. Todos los ratones tratados con anticuerpo mostraron niveles altos de LDLR en comparación con los ratones de control de PBS.

La Figura 13 ilustra que el anticuerpo antagonista anti-PCSK9 no tiene
 10 efecto en el ratón LDLR $-/-$. A ratones LDLR $-/-$ de ocho semanas de edad (ratones KO de LDLR) se administraron 10 mg/kg de 4A5 o solución salina el día 0 mediante inyección i.p. en embolada. Se recogieron muestras de suero (de $n=9-10$ ratones) y se ensayaron para determinar niveles de colesterol el día 7. La administración del anticuerpo no alteró de forma apreciable los niveles
 15 de colesterol en suero total, HDL o LDL.

La Figura 14 ilustra que los tratamientos múltiples de anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 en ratones pueden disminuir sustancialmente el colesterol en suero total. A ratones C57/bl6 de ocho semanas de edad se administraron las dosis indicadas de anticuerpos o PBS los días 0, 7, 14 y 21
 20 mediante inyección rápida i.v.. Se recogieron muestras de suero ($n=5-11$ ratones) y se ensayaron para determinar niveles de colesterol el día 28.

Ejemplo 8: Los Anticuerpos Antagonistas de PCSK9 Disminuyen LDL en Suero en Primates No Humanos.

Para ensayar el efecto *in vivo* de anticuerpos para PCSK9, se ensayó
 25 anticuerpo 7D4 en monos cynomolgus. A cuatro monos cynomolgus de 3-4

12A

años de edad se inyectó vehículo (PBS + Tween 20 al 0,01%) el día 0, y 10 mg/kg de 7D4 el día 7. Los perfiles de lípidos en plasma se analizaron los días 0, 2, 7, 9, 11, 14, 21 y 28 a continuación de ayunas durante una noche. Una inyección única de 10 mg/kg de 7D4 produjo una reducción espectacular en los valores de LDL en plasma (el 60%) (Figura 15A) y de números de partícula de LDL (Figura 15D) en los 4 animales, mientras que tuvo efecto mínimo en los niveles de HDL (Figura 15B) y números de partícula de HDL (Figura 15E). El colesterol total (Figura 15C) también se redujo a continuación del tratamiento con 7D4, mientras que el nivel de triglicéridos (Figura 15F) no se afectó de forma significativa. También se midieron los niveles de 7D4 total (G) y PCSK9 total (H).

La Figura 16 ilustra la dosis-respuesta de anticuerpo anti-PCSK9 7D4 sobre niveles de colesterol en suero en los monos cynomolgus. A dos machos y dos hembras de monos cynomolgus del 3-5 años de edad en cada grupo se proporcionó la dosis indicada de 7D4 el día 7 y un volumen igual de solución salina el día 0 mediante inyección rápida i.v. Se tomaron muestras de plasma en puntos de tiempo indicados y se midieron los niveles de LDL en plasma.

La Figura 17 ilustra una comparación de anticuerpos anti-PCSK9 4A5, 5A10, 6F6 y 7D4 sobre los niveles de colesterol en suero en los monos cynomolgus. A dos machos y dos hembras de monos cynomolgus de 3-6 años de edad en cada grupo se administró 1 mg/kg del anticuerpo indicado el día 0 mediante inyección rápida i.v.. Se tomaron muestras de plasma en puntos de tiempo indicados, se midieron los niveles de LDL en plasma y se normalizaron a los del día 2.

La Figura 18 ilustra el efecto de anticuerpo antagonista anti-PCSK9 7D4 sobre niveles de colesterol en plasma de monos cynomolgus alimentados con una dieta grasa del 33,3% kcal complementada con el 0,1% de colesterol. Seis monos cynomolgus de 3-5 años de edad se pusieron en dieta alta en grasas durante 16 semanas. Tres monos se trataron con 10 mg/kg de 7D4 y tres con solución salina en la fecha indicada. Se midieron los niveles de LDL de monos individuales y se normalizaron a los del día de tratamiento.

Ejemplo 9: Anticuerpo Anti-PCSK9 Humanizado

El anticuerpo monoclonal murino 5A10 se humanizó y se maduró por afinidad para proporcionar el anticuerpo L1L3. L1L3 tiene una afinidad por PCSK9 murino de 200 pM y una afinidad por PCSK9 humano de 100 pM cuando se mide por Biacore. L1L3 inhibe completamente la regulación por disminución mediada por PCSK9 de LDLR en células Huh7 cultivadas cuando se incuba con anticuerpo PCSK9 humano o murino 100 nM. Véase la Figura 19.

La Figura 20 ilustra la dosis respuesta de L1L3, precursor de ratón 5A10 y anticuerpo de control negativo 42H7 para bloquear la unión de PCSK9 humano y PCSK9 de ratón biotinilado recombinante a dominio extracelular de LDLR recombinante inmovilizado *in vitro*. La Figura 20A muestra unión de PCSK9 humano a dominio extracelular de LDLR humano a pH 7,5. La Figura 20B muestra la unión de PCSK9 humano a dominio extracelular de LDLR humano a pH 5,3. La Figura 20C muestra unión de PCSK9 de ratón a dominio extracelular de LDLR humano a pH 7,5. La Figura 20D muestra unión de PCSK9 de ratón a dominio extracelular de LDLR humano a pH 5,3.

La Figura 21 muestra el efecto sobre el colesterol en suero de

tratamiento con 10 mg/kg de L1L3 en ratones. Dos grupos (n= 8/grupo) de ratones C57/bl6 de 8 semanas de edad se dosificaron con 10 mg/kg de L1L3 o un volumen igual de solución salina mediante inyección i.p. el día 0. Se recogieron muestras de suero y se ensayaron para determinar niveles de colesterol los días 2, 4 y 7. L1L3 disminuyó el colesterol en suero total en aproximadamente el 40% los días 2 y 4. En otro estudio, cuando se administraron 10 mg/kg de L1L3 como una dosis intraperitoneal (IP) única a ratones C57BL/6 alimentados con una dieta normal (n= 10), los niveles de colesterol en suero se redujeron en el 47% en comparación con controles tratados con solución salina, 4 días después del tratamiento. Cuando se administró L1L3 como una dosis IP única a 0, 0,1, 1, 10 y 80 mg/kg (n= 6/grupo) en un experimento de dosis respuesta en ratas Sprague-Dawley macho alimentadas con una dieta normal, los niveles de colesterol en suero se redujeron de forma dependiente de dosis, con el efecto máximo del 50% observado a 10 y 80 mg/kg, 48 horas después de la dosificación. La duración de la represión de colesterol también fue dependiente de dosis, variando de 1 a 21 días.

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada completamente humanizada de L1L3 (SEC ID N°: 15) se muestra en la Tabla 8. La secuencia de la región variable está subrayada (SEC ID N°: 54).

Tabla 8

<u>qvqlvqsgae</u>	<u>vkkgqasvkv</u>	<u>sckasgytft</u>	<u>svymhwvrga</u>	<u>pqqglewmge</u>
<u>ispfggrtny</u> 60				
<u>nekfkarytm</u>	<u>trdtststvy</u>	<u>melsslrsed</u>	<u>tavyycarer</u>	<u>plyasdlwgg</u>
<u>gttytvsgas</u> 120				
<u>tkgpsvfpla</u>	<u>pcsrstsest</u>	<u>aalgclvkdy</u>	<u>fpepvtvswn</u>	<u>sgaltsgvht</u>
<u>fpavlgasgl</u> 180				
<u>yelssvvtvp</u>	<u>ssnfgtqtyt</u>	<u>cnvdhkpent</u>	<u>kvdktverkc</u>	<u>cvecppcpap</u>
<u>pvagpsvflf</u> 240				
<u>ppkpkdtlmi</u>	<u>srtpevtcvv</u>	<u>vdvshedpev</u>	<u>qfnwyvdgve</u>	<u>vhnaktkpre</u>
<u>eqfnstfrvv</u> 300				
<u>svltvvhqdw</u>	<u>lngkeykckv</u>	<u>snkglpssie</u>	<u>ktisktkgqp</u>	<u>repqvytlpp</u>
<u>sreemtknqv</u> 360				
<u>sltclvkgfy</u>	<u>psdiavewes</u>	<u>ngqpennykt</u>	<u>tppmldsds</u>	<u>fflyskltvd</u>
<u>ksrwqqgnvf</u> 420				
<u>scsvmhealh</u>	<u>nhytqksls</u>	<u>spgk</u> 444		

La secuencia de aminoácidos de cadena ligera completamente humanizada de L1L3 (SEC ID N°: 14) se muestra en la Tabla 9. La región variable está subrayada (SEC ID N°: 53).

Tabla 9

<u>diqmtgppss</u>	<u>lsasvqdrvt</u>	<u>itcrasggig</u>	<u>salawyqgkp</u>	<u>gkapklliys</u>
<u>asyrytgups</u> 60				
<u>rfsgsgsgtd</u>	<u>ftftisslqp</u>	<u>ediatyvccq</u>	<u>ryslwrtfgq</u>	<u>gtnleikrtv</u>
<u>aapsvfifpp</u> 120				
<u>sdeqlksgta</u>	<u>svvcllnnfy</u>	<u>preakvqwk</u>	<u>dnalgsgnsg</u>	<u>esvteqdskd</u>
<u>styslsstlt</u> 180				
<u>lskadyekhk</u>	<u>vyacevthqg</u>	<u>lsspvtksfn</u>	<u>rgec</u> 214	

La Figura 22 muestra el efecto de administración intravenosa de una dosis eficaz (3 mg/kg) de anticuerpo 5A10 (círculos sólidos) o anticuerpo L1L3 (cuadrados sólidos) a cada uno de cuatro monos cynomolgus el día cero. El cambio en HDL en suero (Figura 22A) y LDL en suero (Figura 22B) se midió de

178
B

los días -2 a +28. Ambos anticuerpos dieron como resultado una disminución mayor que aproximadamente el 70% en niveles de LDL en suero en aproximadamente siete días, un efecto que persistió sustancialmente durante aproximadamente seis días más en los animales a los que se administró L1L3.

- 5 Todos los animales mostraron función de hígado y riñón normal y hematocritos casi normales.

- L1L3 redujo de forma dependiente de dosis LDL-C, con un efecto máximo observado en el grupo de 10 mg/kg, que mantuvo una reducción del 70% en niveles de LDL-C hasta el día 21 después de la dosificación y recuperado completamente para el día 31. Los niveles de HDL-C no se influyeron por tratamiento de L1L3 en todos los grupos de dosis. A los animales en el grupo de dosis de 3 mg/kg (n= 4) también se proporcionaron dos dosis IV adicionales de 3 mg/kg de L1L3 los días de estudio 42 y 56 (2 semanas de separación). Estas dos dosis adicionales disminuyeron de nuevo LDL-C y mantuvieron los niveles de LDL-C por debajo del 50% durante 4 semanas. Los niveles de LDL-C volvieron a la normalidad dos semanas más tarde. Los niveles de HDL-C en suero permanecieron sin cambios durante todo el estudio.
- 10
15

- Se investigó la eficacia de L1L3 en primates no humanos con hipercolesterolemia e interacciones farmacodinámicas entre L1L3 y estatinas inhibitoras de HMG-CoA reductasa. Antes del inicio del estudio, los niveles de LDL-C de una cohorte de monos cynomolgus (n= 12) se elevaron hasta un promedio de 120 mg/dl, en comparación con los niveles promedio normales de 50 mg/dl, alimentándolos con una dieta que contenía el 35% de grasa (p/p) y 600 ppm de colesterol durante más de 18 meses. Sorprendentemente, no se observó ningún efecto sobre los niveles de colesterol total en suero o LDL-C
- 20
25

después de la administración diaria de una dosis media (10 mg/animal) de Crestor® (rosuvastatina de calcio) durante 6 semanas y después de una administración diaria posterior de dosis alta (20 mg/kg) durante 2 semanas. Una administración única de 3 mg/kg de L1L3 con Crestor® o tratamiento con
5 vehículo durante 2 semanas, redujo de forma eficaz los niveles de LDL-C en suero en el 56% para el día 5 después del tratamiento y se recuperó gradualmente en 2,5 a 3 semanas mientras que no influía en los niveles de HDL-C. Tras el cambio de los animales a administración diaria de 50 mg/kg de Zocor® (simvastatina), sus niveles de LDL-C alcanzaron una reducción máxima
10 del 43% el día 5 y se estabilizaron a partir de entonces. Después de 3 semanas de administración de 50 mg/kg/día de Zocor®, estos animales se trataron con una dosis única de 3 mg/kg de L1L3 mientras que continuaban recibiendo 50 mg/kg/día de Zocor®. La administración de L1L3 dio como resultado otra reducción adicional del 65% en LDL-C, además de la reducción del 43%
15 mediante Zocor®, para el día 5, y volvieron a los niveles anteriores a la dosificación en el curso de 2 semanas.

Se realizaron otras sustituciones de aminoácidos de CDR a 5A10 en el transcurso de humanización y maduración por afinidad y para conseguir propiedades particulares. Las secuencias de las CDR modificadas y las
20 capacidades de unión a PCSK9 de los anticuerpos que contenían estas CDR modificadas se exponen en las Figuras 24 A-G. Los números a continuación de cada secuencia en las Figuras 24 A-G representan la SEC ID N° para esa secuencia.

Las descripciones de todas las referencias citadas en este documento se
25 incorporan mediante el presente como referencia en este documento.

179
182

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista de PCSK9 que comprende un anticuerpo aislado, un péptido o un aptámero que interacciona con PCSK9 y, cuando se administra a un sujeto, reduce el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) en sangre en dicho sujeto.
- 10 2. Un anticuerpo anti-PCSK9 aislado que se une específicamente a PCSK9 y que es un antagonista completo del efecto mediado por PCSK9 en niveles de receptor de LDL (LDLR) medido *in vitro* usando un ensayo de regulación por disminución de LDLR en células Huh7.
- 15 3. Un anticuerpo aislado que antagoniza la interacción extracelular de PCSK9 con LDLR, medida por la unión de PCSK9 al LDLR *in vitro* y, cuando se administra a un sujeto, reduce el colesterol LDL en sangre en dicho sujeto.
4. El anticuerpo de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que el anticuerpo es
20 humanizado, humano o quimérico.
5. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo reconoce un epítipo en PCSK9 humano que comprende restos de aminoácidos 153-155, 194, 195, 197, 237-239, 367, 369, 374-379 y 381 de la secuencia de
25 aminoácidos de PCSK9 de SEC ID N°: 53.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que el epítipo de anticuerpo en PCSK9 humano no comprende uno o más de los restos de aminoácidos 71, 72, 150-152, 187-192, 198-202, 212, 214-217, 220-226, 243, 255-258, 317, 5 318, 347-351, 372, 373, 380, 382 y 383 de la secuencia de aminoácidos de PCSK9 de SEC ID N°: 53.

7. El anticuerpo de la reivindicación 3, anticuerpo que reconoce un epítipo en PCSK9 humano que se solapa con más de aproximadamente el 75% de la 10 superficie en PCSK9 que interacciona con el dominio similar a EGF del LDLR.

8. Un anticuerpo aislado que comprende una región de unión a PCSK9 que compite con o reconoce un primer epítipo de PCSK9 que se solapa con un segundo epítipo que es reconocido por un anticuerpo monoclonal 15 seleccionado entre el grupo constituido por 5A10, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8986; 4A5, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8985; 6F6, 20 que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8984 y 7D4, que se produce por una línea celular de hibridoma depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo y a la que se ha asignado el número de acceso PTA-8983.

9. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PCSK9 y comprende una región determinante de complementariedad uno (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH), que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 8, 59 ó 60, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 9 ó 61 y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 10 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.
10. Un anticuerpo aislado que comprende una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 12 y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 13 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10 que comprende además una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 59 u 8, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 61 ó 9 y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 10 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que la variante de la CDR1 de VH comprende una sustitución en la posición de aminoácido 8 de SEC ID N°:

59, una variante de la CDR2 de VH comprende una sustitución en una o más posiciones de aminoácido 3, 4, 5, 6 y 7 de SEC ID N°: 9 y/o una variante de la CDR3 de VH que comprende una sustitución en una o ambas de las posiciones de aminoácido 7 y 9 de SEC ID N°: 10.

5

13. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que la región VH comprende SEC ID N°: 54 y la región VL comprende SEC ID N°: 53.

14. Un anticuerpo humanizado constituido por una cadena ligera que tiene
10 SEC ID N°: 14, una cadena pesada que tiene SEC ID N°: 15, con o sin la lisina C-terminal de SEC ID N°: 15 o tanto una cadena ligera que tiene SEC ID N°: 14 como una cadena pesada que tiene SEC ID N°: 15, con o sin la lisina C-terminal de SEC ID N°: 15.

15 15. El anticuerpo de la reivindicación 14, comprendiendo el anticuerpo además una región constante inmunológicamente inerte.

16. El anticuerpo de la reivindicación 15, teniendo el anticuerpo un isotipo que se selecciona entre el grupo constituido por IgG₂, IgG₄, IgG_{2Δa}, IgG_{4Δb},
20 IgG_{4Δc}, IgG₄, S228P, IgG_{4Δb} S228P y IgG_{4Δc} S228P.

17. El anticuerpo de la reivindicación 16, en el que la región constante es Fc aglicosilada.

25 18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad

181
18A

terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la reivindicación 2.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de una estatina.

5

20. Una célula huésped que produce de forma recombinante el anticuerpo de la reivindicación 2.

21. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la reivindicación

10 2.

22. Un procedimiento para reducir un nivel de colesterol-LDL en sangre de un sujeto que necesita el mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la reivindicación 2.

15

23. Una línea celular que produce de forma recombinante un anticuerpo de PCSK9 o una parte de unión a antígeno del mismo, seleccionándose la línea celular entre el grupo constituido por:

- a) 4A5 que tiene un N° de Acceso de ATCC de PTA-8985;
- 20 b) 5A10 que tiene un N° de Acceso de ATCC de PTA-8986;
- c) 6F6 que tiene un N° de Acceso de ATCC de PTA-8984 y
- d) 7D4 que tiene un N° de Acceso de ATCC de PTA-8983;

24. Una línea celular que produce de forma recombinante un anticuerpo que
25 se une específicamente a PCSK9 y comprende una región determinante de

- complementariedad uno (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 8, 59 ó 60, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 9 ó 61 y/o una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en
- 5 SEC ID N°: 10 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR3 y/o CDR3 y/o comprende una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 11, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 12 y/o una CDR de VL que
- 10 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 13 o una variante las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.

182
185**RESUMEN**

La presente invención proporciona anticuerpos antagonizantes, partes de unión a antígeno de los mismos y aptámeros que se unen a proproteína convertasa subtilisina kexina de tipo 9 (PCSK9). También se proporcionan anticuerpos dirigidos a péptidos, uniéndose los anticuerpos a PCSK9. La invención proporciona además un procedimiento para obtener tales anticuerpos y ácido nucleico que codifica anticuerpo. La invención se refiere además a procedimientos terapéuticos para uso de estos anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos para reducir los niveles de colesterol-LDL y/o para el tratamiento y/o prevención de enfermedad cardiovascular, que incluye el tratamiento de hipercolesterolemia.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rinat Neuroscience Corporation Pfizer Inc.

<120> Antagonistas de PCSK9

<130> PC33718A

5 <160> 187

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Thr Ser Ile Gln Ser Asp His Arg Glu Ile Glu Gly Arg Val
1 5 10 15

<210> 2

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Arg Asp Ala Gly Val Ala Lys Gly Ala
1 5 10

<210> 3

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Ser Asp Cys Ser Thr Cys Phe
1 5

<210> 4

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Gly Ser Leu Val Glu
1 5

10 <210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 5

Gln Pro Val Gly Pro Leu
1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 6

His Gly Ala Gly Trp
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Glu Pro Glu Leu
1 5

<210> 8

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> CDR DE CADENA PESADA VARIABLE

<400> 8

Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 9

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

287

<400> 9

5 Ser

$\langle 211 \rangle$ 9

<213> Artificial

<220>

<400> 10

15

$\langle 211 \rangle$ 11

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> CDR DE CADENA LIGERA VARIABLE

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 12

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR DE CADENA LIGERA VARIABLE

<400> 12

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 13

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> CDR DE CADENA LIGERA VARIABLE

<400> 13

185
186

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg Thr
1 5

<210> 14

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CADENA LIGERA DE L1L3 HUMANIZADA

10 <400> 14

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

186
189

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> CADENA PESADA DE L1L3 HUMANIZADA

10 <400> 15

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

- <210> 16
- <211> 108
- <212> PRT
- 5 <213> Mus musculus

<400> 16

191

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Leu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 17

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 18

189
192

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 20

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 20

190
193

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Tyr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Leu Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 21

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

<210> 22

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Gly Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 23

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Val Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ile Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO DE UNIÓN

10 <400> 24

192
795

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 25

<211> 642

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA LIGERA HUMANIZADA

10 <400> 25

gatatacaaa	tgacacaatc	tccatcctct	ctttccgcat	cagtcggcga	ccgcgtaacc	60
atcacatgta	gagcttctca	aggcatctcc	tccgccctcg	catggtacca	acaaaaacca	120
ggtaaagccc	caaaactcct	catatactca	gcttcataca	gatacacccg	cgtaccctca	180
agattctcag	gttcaggctc	tggaacagac	tttactttca	ccatttcatc	actccaaccc	240
gaagacatag	ctacatatta	ctgccaacaa	agatacagcc	tctggagaac	atctggccaa	300
ggaacaaaac	tcgagatcaa	acgtacggtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgcca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaactgcc	tctgttgtgt	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggt	gataacgccc	tccaatcggg	taactoccag	480
gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	540
ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	600
ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gt		642

<210> 26

<211> 1332

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DE CADENA PESADA
HUMANIZADA

5

<400> 26

caagttcaac	tcgttcaatc	tggagcagaa	gtaaaaaac	ctggcgctc	tgtaaagta	60
agttgtaaag	catccggtta	cacattcaca	tcattattaca	tgattgggt	aagacaagcc	120
cctggacaag	gactcgaatg	gatgggtgaa	atctctcctt	ttggcgccg	aacaaactat	180
aatgaaaaat	ttaaatcccg	cgtaactatg	acccgagaca	catccacatc	tactgtttat	240
atggaacttt	cctcaactgg	ttctgaagac	actgotgttt	attactgtgc	acgcgaaaga	300
cctctctacg	cttccgatct	ctggggccaa	ggaacaacgg	tcaccgtctc	ctcagcctcc	360
accaagggcc	catctgtctt	cccactggcc	ccatgtctcc	gcagcacctc	cgagagcaca	420
gccgccttgg	gctgcctggg	caaggactac	ttcccagaac	ctgtgaccgt	gtcctggaac	480
tctggcgctc	tgaccagcgg	cgtgcacacc	ttcccagctg	tcctgcagtc	ctcaggtctc	540
tactccctca	gcagcgtggg	gaccgtgcca	tccagcaact	tcggcaccca	gacctacacc	600
tgcaacgtag	atcacaagcc	aagcaacacc	aaggtagata	agaccgtgga	gagaaagtgt	660
tgtgtggagt	gtccaccttg	tccagcccct	ccagtggccg	gaccatccgt	gttctctgtc	720

193

196

cctccaaagc caaaggacac cctgatgato tccagaaccc cagaggtgac ctgtgtggtg 780
gtggacgtgt cccacgagga cccagaggtg cagttcaact ggtatgtgga cggagtggag 840
gtgcacaacg ccaagaccaa gccaaagagag gagcagttca actccacctt cagagtgggtg 900
agcgtgctga ccgtgggtgca ccaggactgg ctgaacggaa aggagtataa gtgtaagggtg 960
tccaacaagg gactgccatc cagcatcgag aagaccatct ccaagaccaa gggacagcca 1020
agagagccac aggtgtatac cctgccccca tccagagagg agatgaccaa gaaccaggtg 1080
tccctgacct gtctgggtgaa gggattctat ccattccgaca tcgccgtgga gtgggagtc 1140
aacggacagc cagagaacaa ctataagacc acccctccaa tgctggactc cgacggatec 1200
ttcttcctgt attccaagct gaccgtggac aagtccagat ggcagcaggg aaacgtgttc 1260
tcttgttccg tgatgcacga ggccctgcac aaccactata cccagaagag cctgtccctg 1320
tctccaggaa ag 1332

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 27

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 28

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 29

Gln Gln Phe Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 30

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10
15

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 31

184
197

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 32

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 33

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

15

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 34

Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 38

Asn Pro Asn Asn Gly Gly
1 5

<210> 39

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 39

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

15 Gly

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

196
199

Asn Pro Ser Asn Gly Arg
1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 44

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 45

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

15

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 46

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 47

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Gly Gly Ile Tyr Tyr Arg Tyr Asp Arg Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

200

<400> 49

Asp Tyr Tyr Met Ala

<210> 50

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Asn Tyr Asp Gly Ser Asn
1 5

10 <210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 51

Asn Ile Asn Tyr Asp Gly Ser Asn Thr Ser Tyr Leu Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 52

Glu Lys Phe Ala Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 53

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Trp Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

198
201

<400> 54

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Phe Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 55

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 56

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10

<210> 57

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

149
1202

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Sintético

<400> 58

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Met	Ala
1				5					10

10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Sintético

<400> 59

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Met	His
1				5					10

20

<210> 60
<211> 7
<212> PRT

290
103

<223> Sintético

<400> 62

Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5			

5 <210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintético

<400> 63

Gly	Gly	Thr	Arg	Val	Val	Ser	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

15 <210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Sintético

<400> 64

201
904

Glu Ile Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 67

Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 68

Glu Ile Asn Pro Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 69

Glu Ile Asn Pro Ser Asp Ser Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

242
705

<400> 70

Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 71

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 71

Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 72

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20

<400> 72

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 73

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 73

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ala Asp Tyr
1 5

<210> 74

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20

<400> 74

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5

<213> Secuencia Artificial

<223> Sintético

10

<213> Secuencia Artificial

<223> Sintético

20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 77

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Lys Asp Tyr
1 5

<210> 78

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 78

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Pro Asp Tyr
1 5

<210> 79

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

264
20A

<223> Sintético

<400> 79

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr
1 5

5 <210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintético

<400> 80

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5

15 <210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Sintético

<400> 81

265
208

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Tyr
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 84

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 85

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Thr Asp Tyr
1 5

<210> 86

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 86

Gln Gln Arg Phe Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

10 <210> 87
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 87

Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr
1 5

20 <210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

26
709

<220>

<223> Sintético

5 <400> 88

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Trp Arg Thr
1 5

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 89

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ala Arg Thr
1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

267
20

Gln Gln Arg Tyr Ser Pro Trp Arg Thr
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 93

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Trp Arg Thr
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 94

Gln Gln Arg Tyr Ser Ile Trp Arg Thr
1 5

<210> 95

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 95
Gln Gln Arg Tyr Ser Ala Trp Arg Thr
1 5

10 <210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 96 .
Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Phe Arg Thr
1 5

20 <210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

268
211

<220>

<223> Sintético

5 <400> 97

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Thr	Arg	Arg	Thr
1				5				

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 98

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Thr	Leu	Tyr	Thr
1				5				

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

269
212

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Glu Arg Thr
1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 102

Gln Gln Arg Tyr Gly Thr Ala Arg Thr
1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 103

Gln Gln Arg Tyr Ser Gln Ala Arg Thr
1 5

<210> 104

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 104

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu His Arg Thr
1 5

10 <210> 105
<2U> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 105

Gln Gln Arg Tyr Ser Gly Val Arg Thr
1 5

20 <210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

210
213

<220>

<223> Sintético

5 <400> 106

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Gln	Ser	Arg	Thr
1				5				

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 107

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Ala	Glu	Arg	Thr
1				5				

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

211
2H

Gln Gln Arg Tyr Ser Cys Ser Arg Thr
1 5

<210> 111

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 111

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Asn Arg Arg
1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 112

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Trp Arg Thr
1 5

<210> 113

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 113

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Pro	Tyr	Arg	Thr
1				5				

10 <210> 114
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 114

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Trp	Arg	Thr
1				5				

20 <210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

212
215

<220>

<223> Sintético

5 <400> 115

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Gly	Phe	Arg	Thr
1				5				

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 116

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Trp	Arg	Thr
1				5				

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

213
216

Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Tyr Arg Thr
1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 120

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gln Arg Thr
1 5

<210> 121

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 121

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Ser Arg Thr
1 5

<210> 122

- <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>

<223> Sintético

<400> 122

Gln Gln Arg Tyr Ser His Ala Arg Thr
1 5
- 10 <210> 123

<211> 9

<212> PRT

<21'3> Secuencia Artificial
- 15 <220>

<223> Sintético

<400> 123

Gln Gln Arg Tyr Ser Lys Tyr Arg Thr
1 5
- 20 <210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

214
218

<220>

<223> Sintético

5 <400> 124

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Gln	Ser	Arg	Thr
1				5				

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 125

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Thr	Ala	Phe	Thr
1				5				

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

215
218

Gln Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Arg Thr
1 5

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 129

Gln Gln Arg Tyr Val Gly Arg Thr
1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 130

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Ser Arg Thr
1 5

<210> 131

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 131
Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gly Arg Thr
1 5

10 <210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 132
Gln Gln Arg Tyr Ser Arg Ala Arg Thr
1 5

20 <210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

219 216

<220>

<223> Sintético

5 <400> 133

Gln Gln Arg Tyr Ser His Ala Arg Thr
1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 134

Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Pro Asp Thr
1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 135

Gln Gln Arg Tyr Gln Gln Pro Arg Thr
1 5

<210> 136

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Sintético

<400> 136

Glu Ile Gln Val Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 137

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Sintético

<400> 137

24
no

Glu	Ile	Asn	Pro	Trp	Gln	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 138

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 138

Glu	Ile	Asn	Pro	Val	Gln	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 139

Glu	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 140

Glu	Ile	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 141

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 141

218
721

Glu Ile Ser Pro Ile Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 142

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 142

Glu Ile Asn Pro Glu His Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 143

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 143

Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Glu	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 144

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 144

Glu	Ile	Asn	Pro	Trp	Met	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 145

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 145

219
711

Glu Ile Asn Pro Gln Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 146

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 146

Glu Ile Asn Pro Val Lys Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 147

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 147

220
223

Glu Ile Gln Ile Ser Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 150

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 150

Glu Ile Asn Pro Gln Gly Thr Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 151

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ser
1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 152

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Arg
1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 153

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Met Asp Arg
1 5

21
21

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Sintético

<400> 154

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Ala
1 5

10

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Sintético

<400> 155

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Val
1 5

20

<210> 156
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 156

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Val
1 5

<210> 157

<211> 9

10 <212> PRT'

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 157

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr
1 5

<210> 158

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

222
75

<223> Sintético

<400> 158

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Val
1 5

5 <210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintético

<400> 159

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ala
1 5

15 <210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Sintético

<400> 160

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Ser
1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 161

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Thr Asp Leu
1 5

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 162

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Ser
1 5

<210> 163

2/13
2/16

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Sintético

<400> 163

Glu	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ala	Asn	Asp	Met
1				5				

10 <210> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Sintético

<400> 164

Glu	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ala	His	Asp	Leu
1				5				

20 <210> 165

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

224
227

<400> 167

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Tyr
1 5

<210> 168

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10

<400> 168

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Arg
1 5

<210> 169

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20

<400> 169

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Ser Asp Val
1 5

<210> 170

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Sintético

<400> 170

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Val
1 5

10

<210> 171

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Sintético

<400> 171

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala Asn Asp Met
1 5

20

<210> 172

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

225
9/16

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

5

<400> 172

Glu Arg Pro Leu Tyr Ala His Asp Leu
1 5

<210> 173

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15

<400> 173

Glu Ile Asn Pro Trp Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 174

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

<400> 174

Glu Ile Asn Pro Val Gln Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

5

Ser

<210> 175

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Sintético

15 <400> 175

Glu Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 176

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

276
77

<223> Sintético

<400> 176

Glu	Ile	Gly	Pro	Trp	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

5 <210> 177

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintético

<400> 177

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Asp	Trp	Arg	Thr
1				5				

15 <210> 178

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Sintético

224
930

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu His Arg Thr
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 181

Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Glu Arg Thr
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

20 <400> 182

Gln Gln Arg Tyr Ser Leu Gln Arg Thr
1 5

<210> 183

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintético

<400> 183
Gln Gln Arg Tyr Ser Thr Arg Arg Thr
1 5

10 <210> 184
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 184
Gln Gln Arg Tyr Ser Asp Trp Arg Thr
1 5

20 <210> 185
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

228
B1

<220>

<223> Sintético

5 <400> 185

Glu	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 186

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

15 <400> 186

Gln	Gln	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr
1				5				

<210> 187

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

729
752

1 de 30

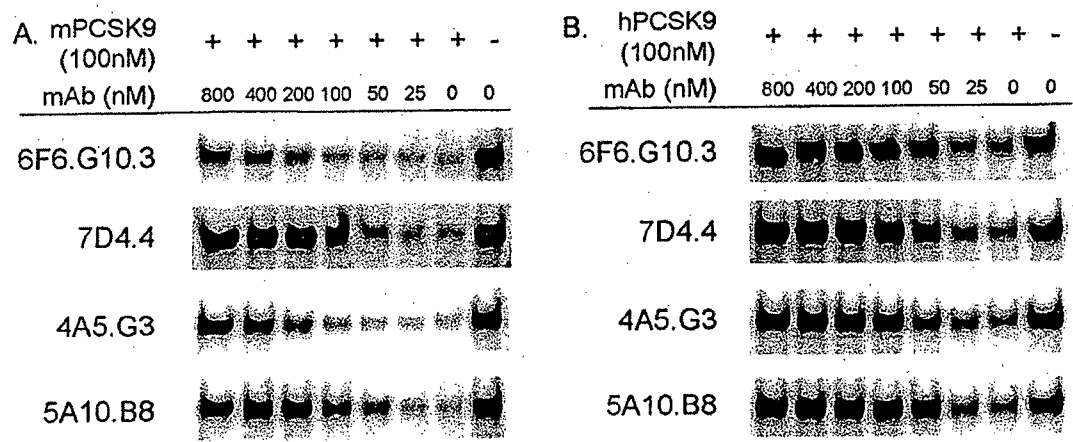
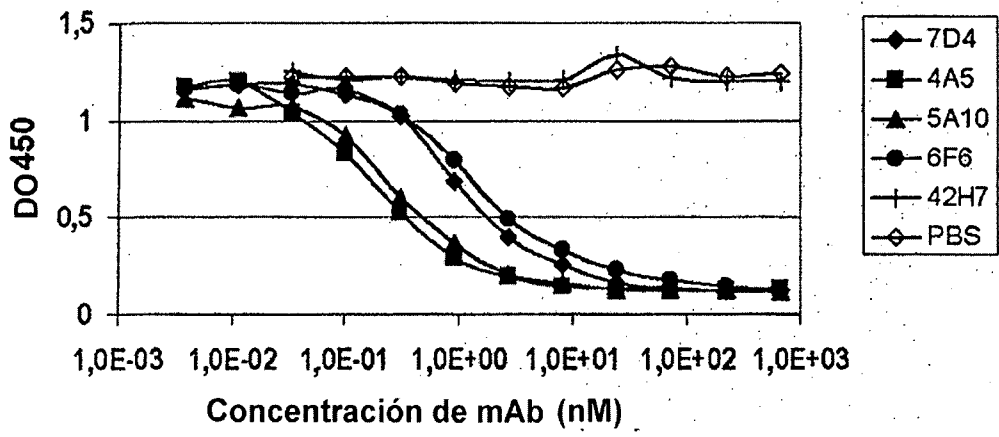


Figura 1

2 de 30

A Unión de PCSK9 humano (0,4 nM)- LDLR humano
pH 7,5



B Unión de PCSK9 de ratón (0,8 nM)- LDLR humano
pH 7,5*

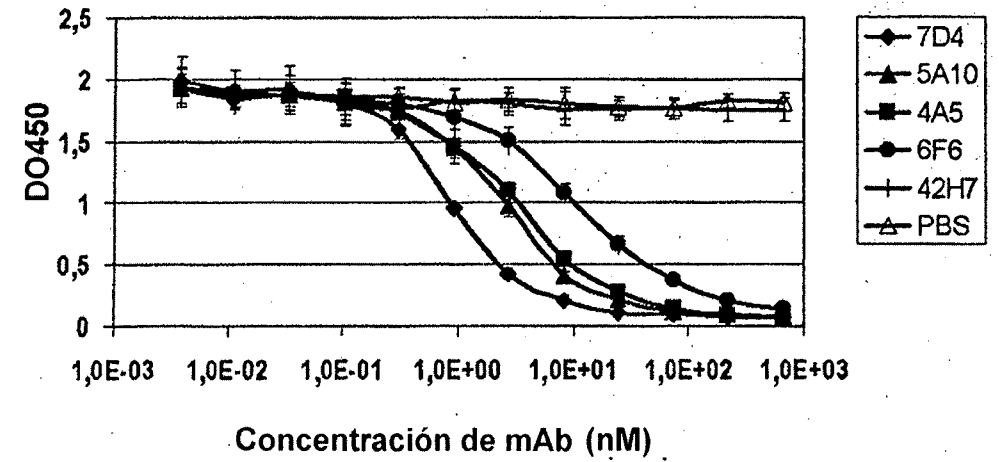


Figura 2

230
233

3 de 30

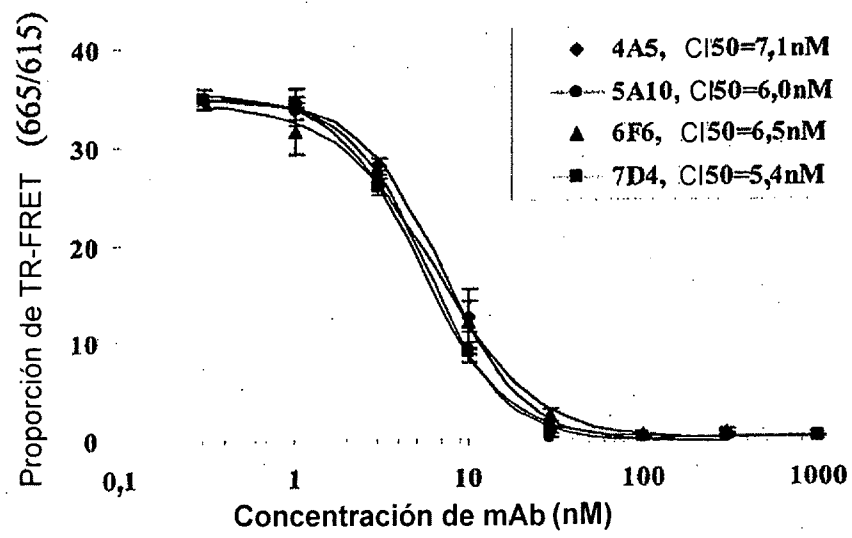


Figura 3

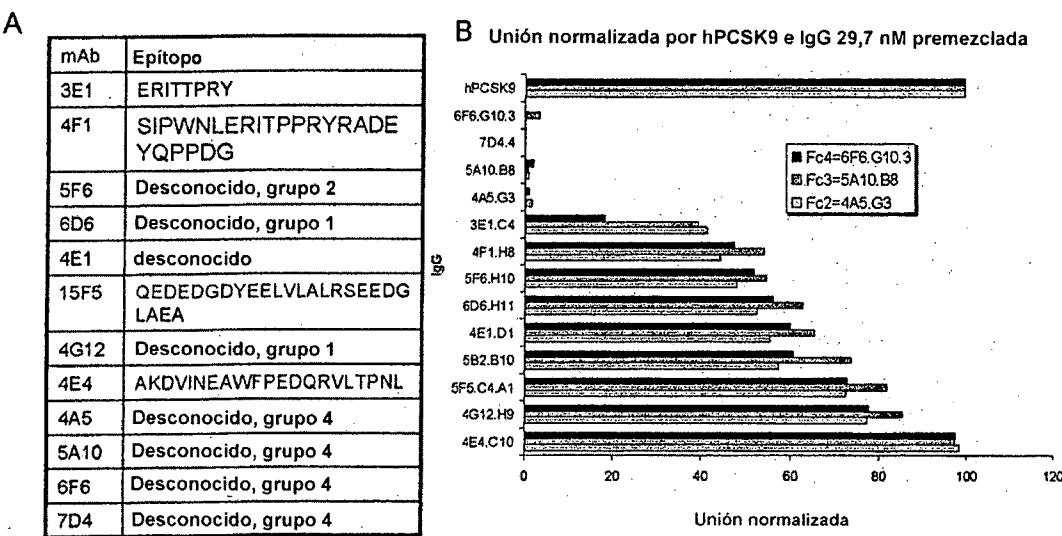


Figura 4

231
234

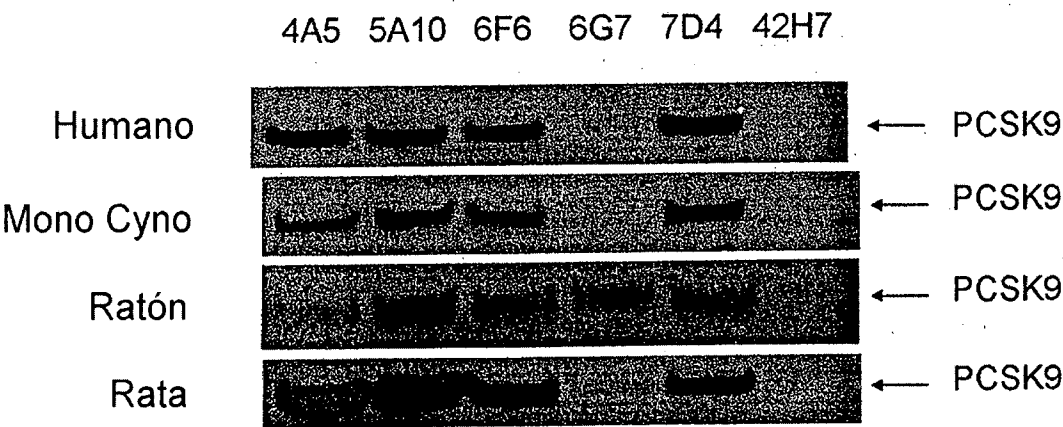


Figura 5

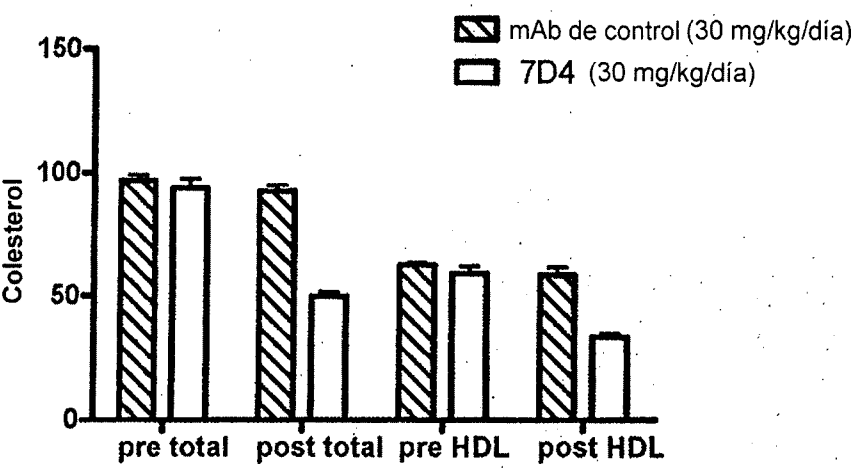


Figura 6

252
AS

7 de 30

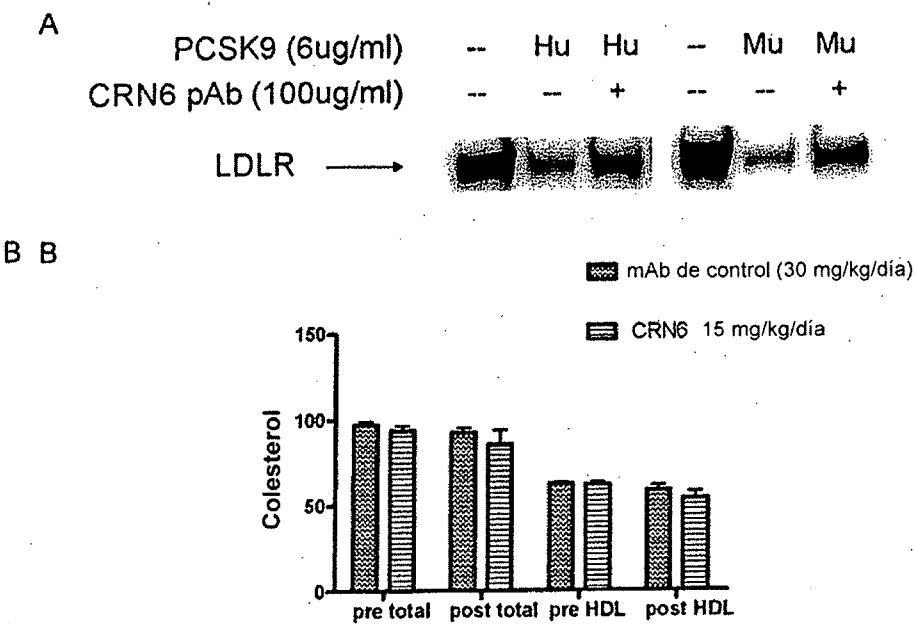


Figura 7

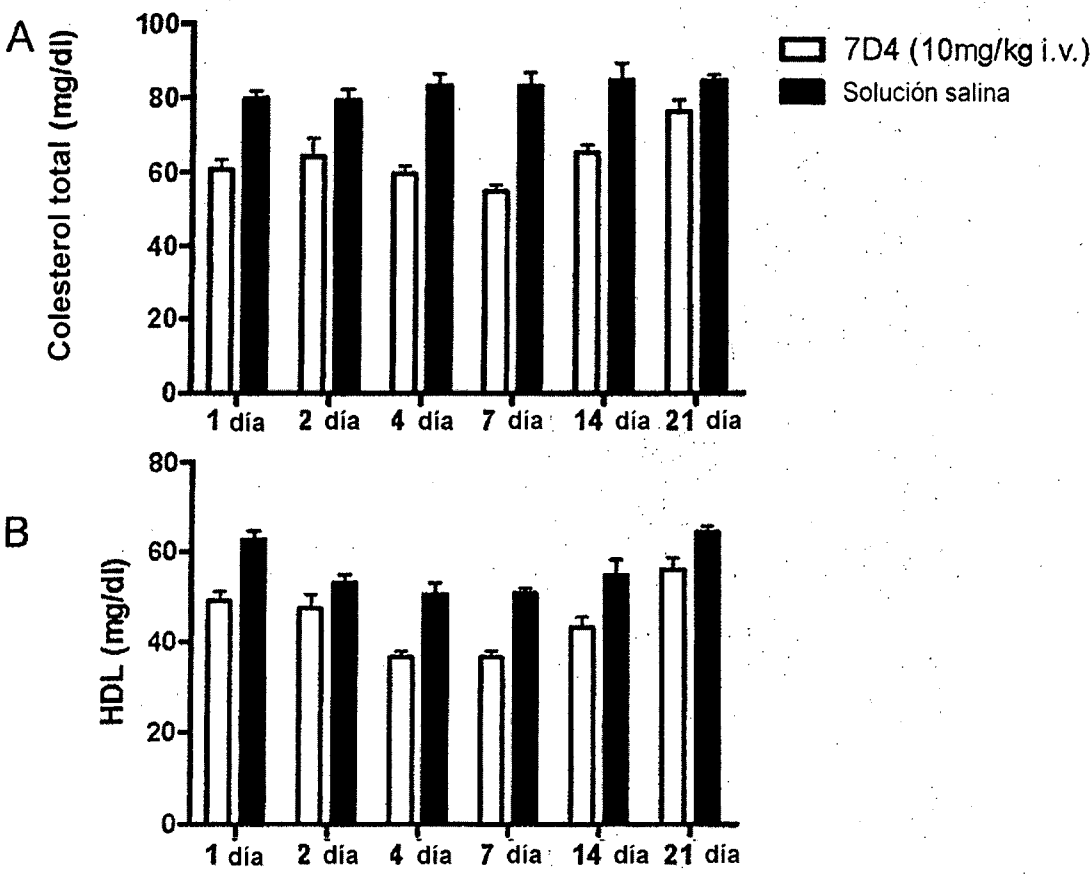


Figura 8

273
736

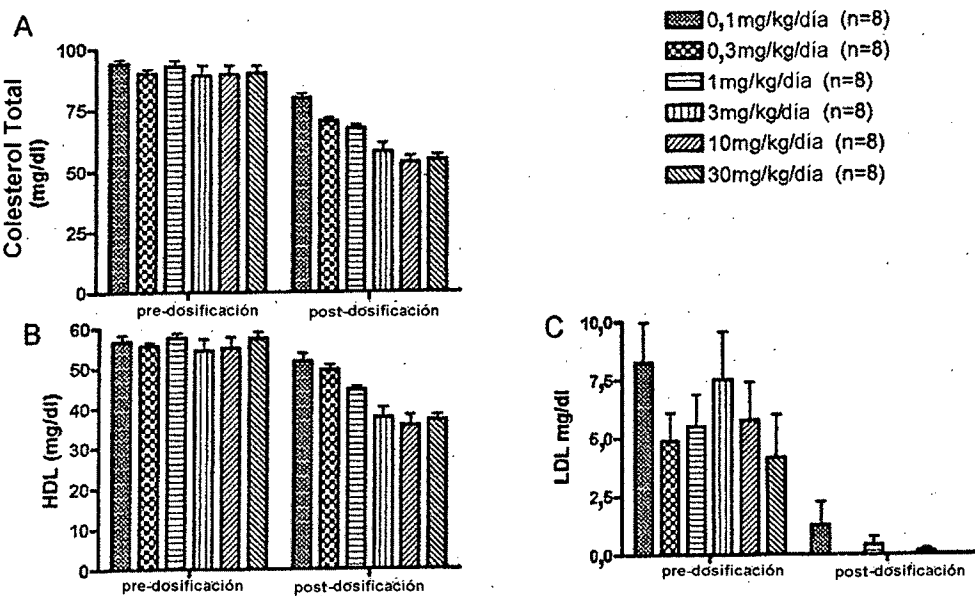


Figura 9

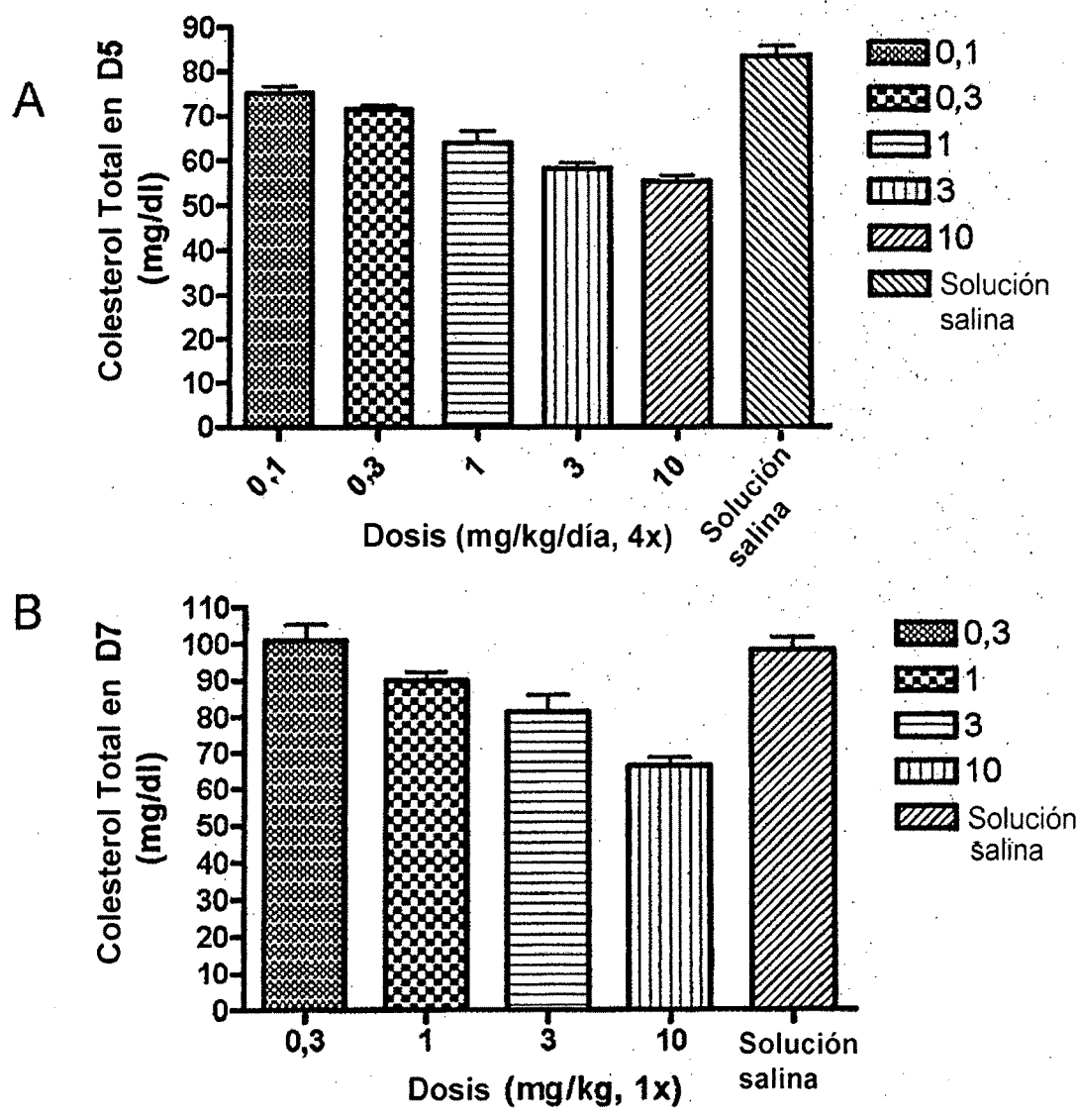


Figura 10

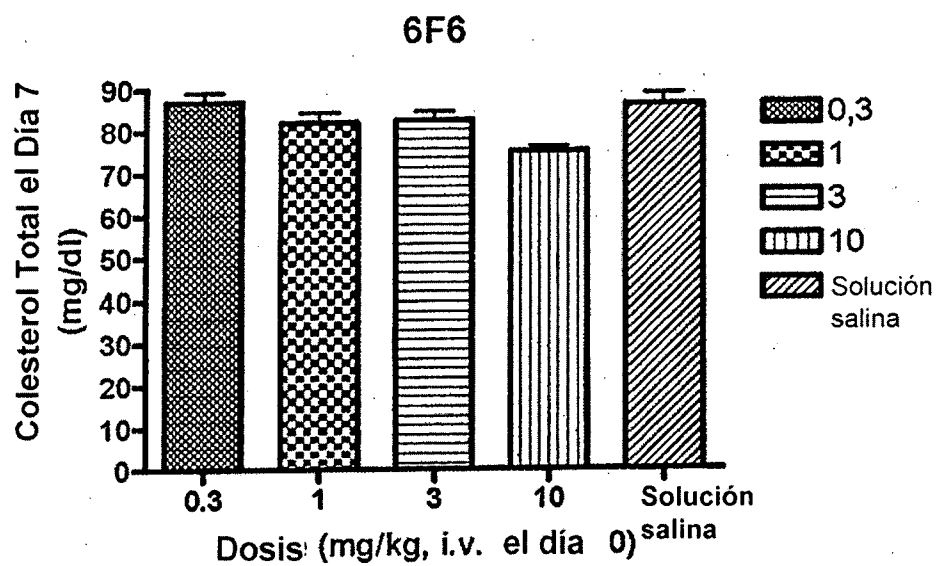
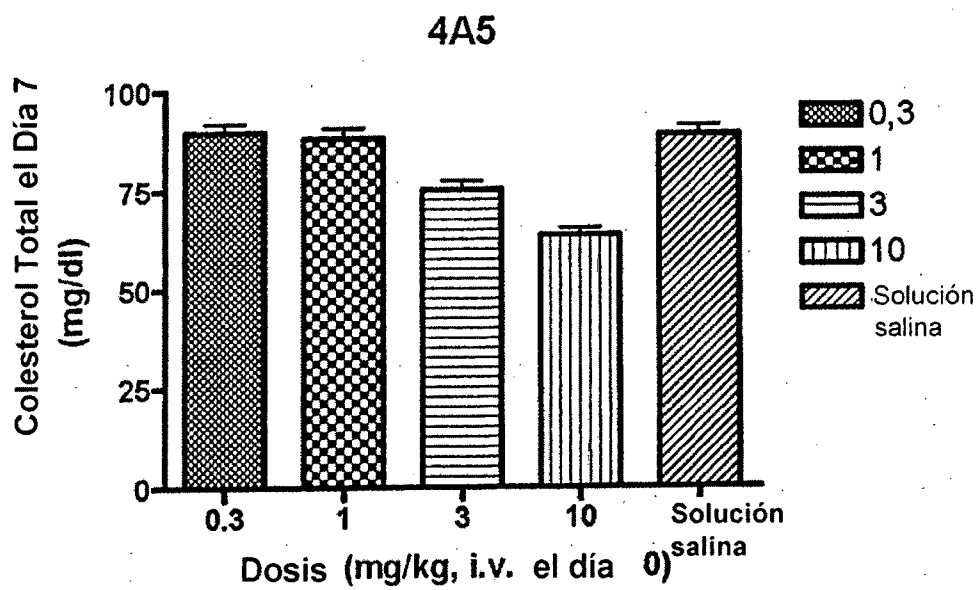


Figura 11

7/35
29/6

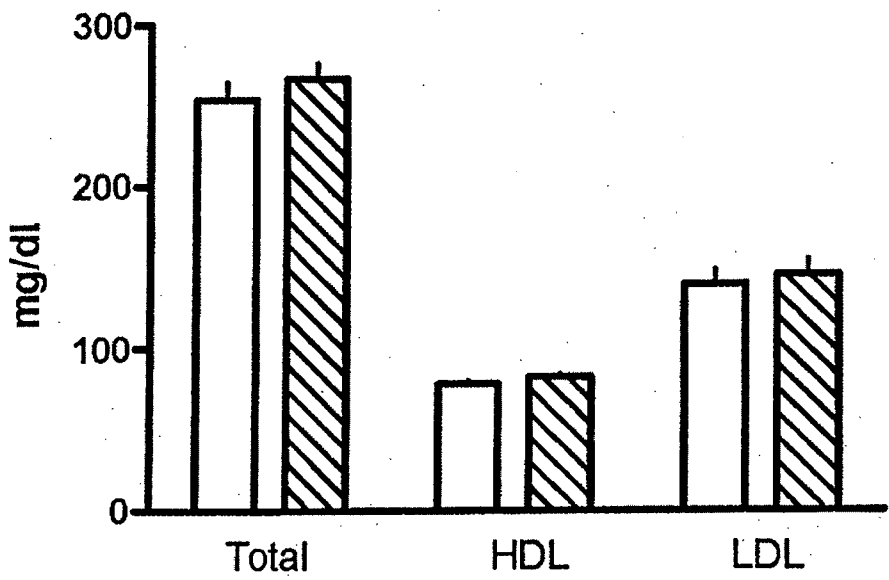


Figura 13

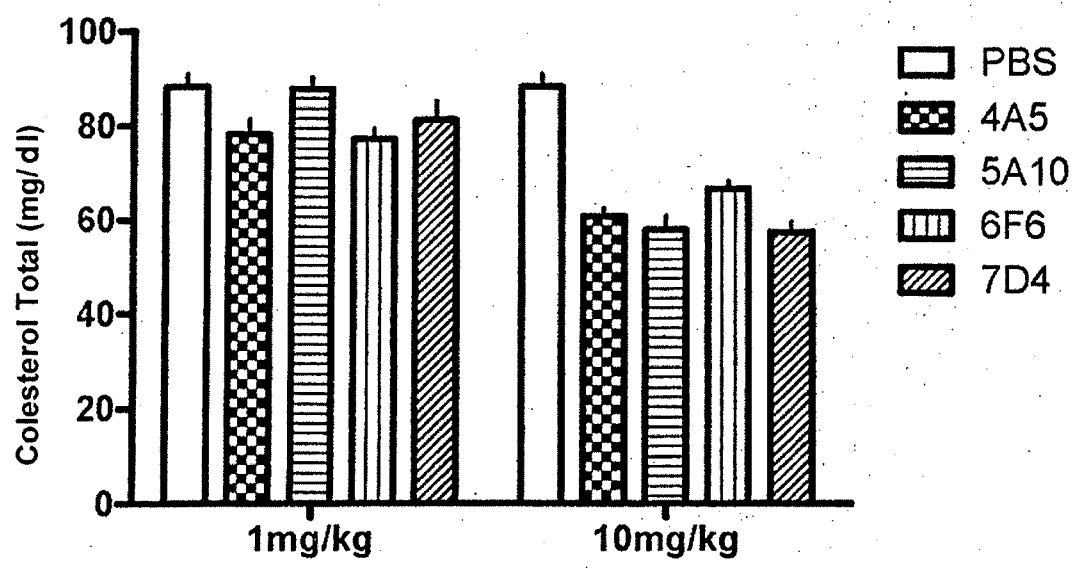


Figura 14

236
239

15 de 30

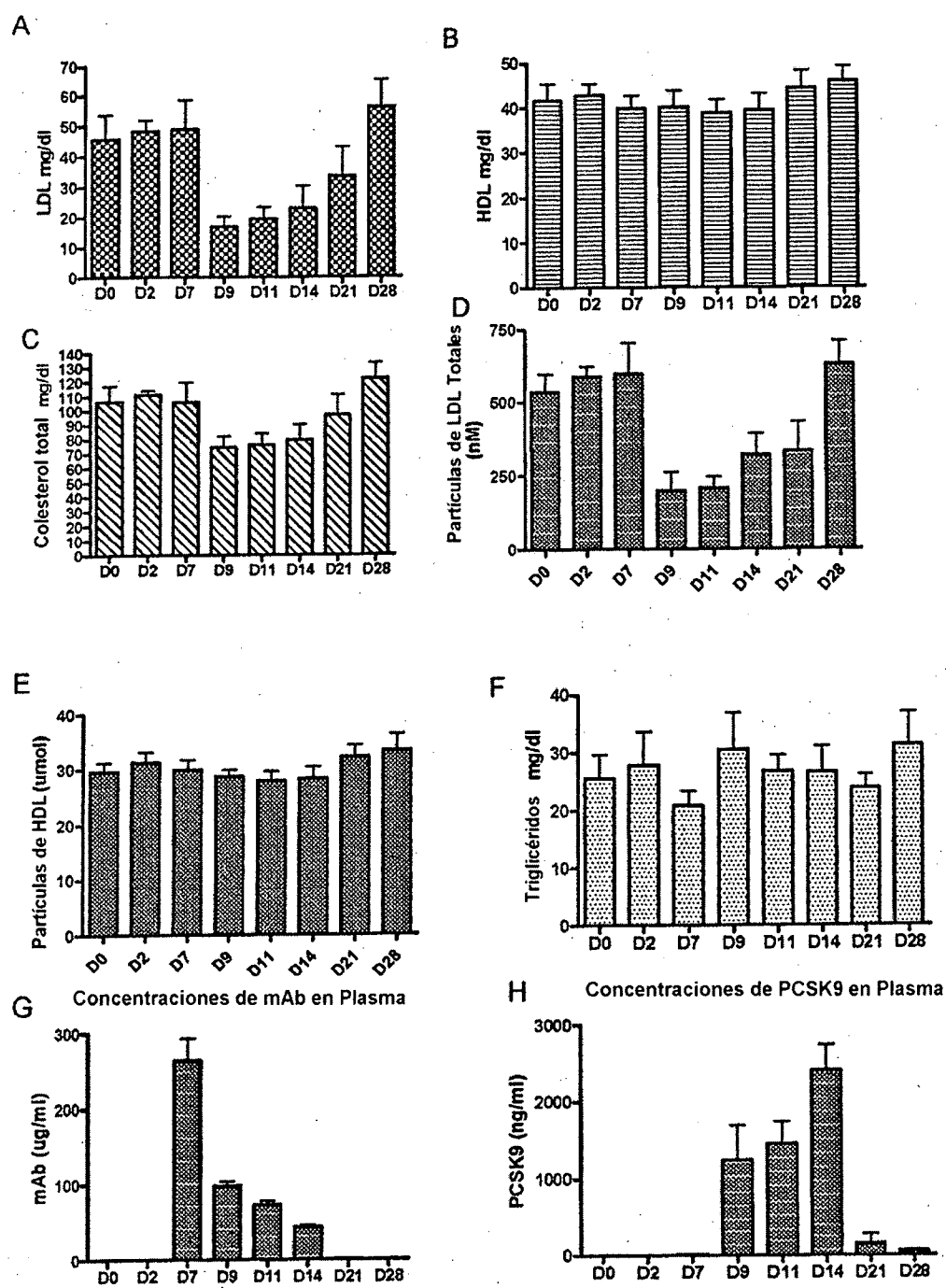


Figura 15

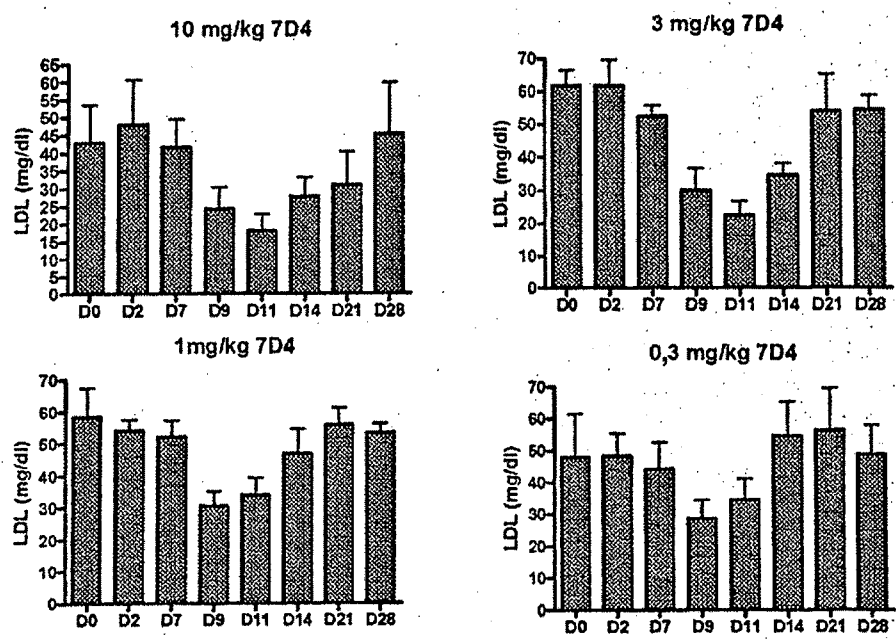


Figura 16

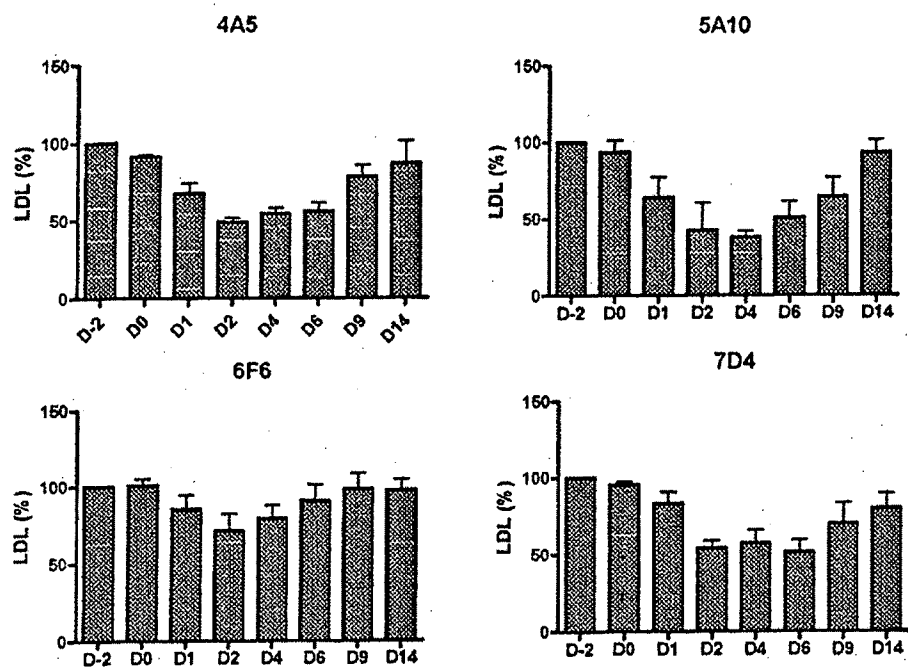


Figura 17

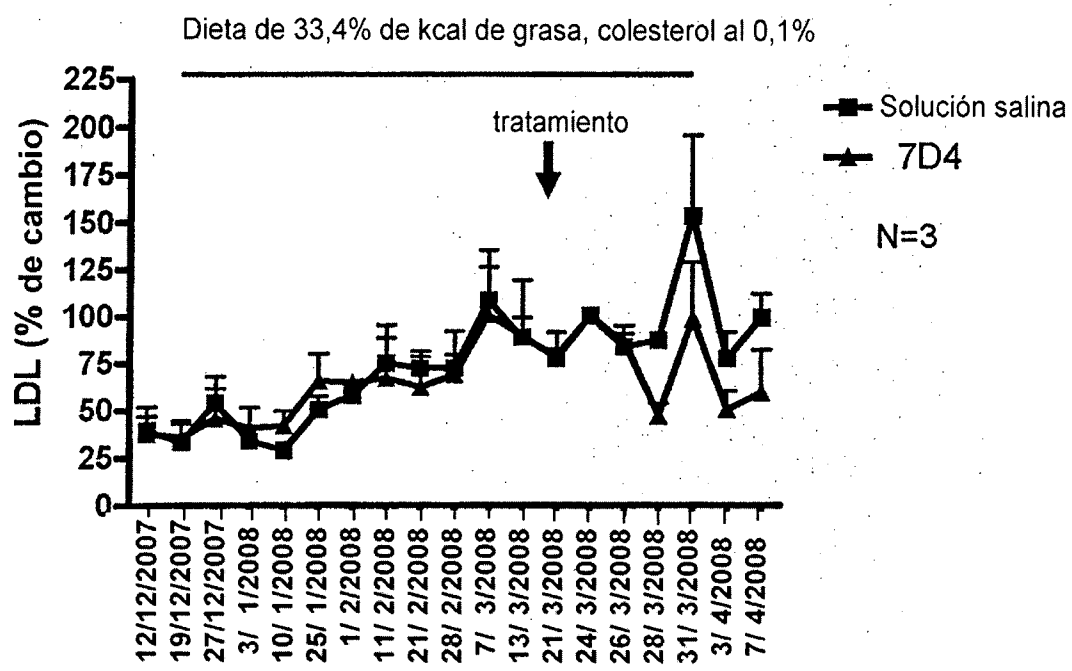


Figura 18

258
241

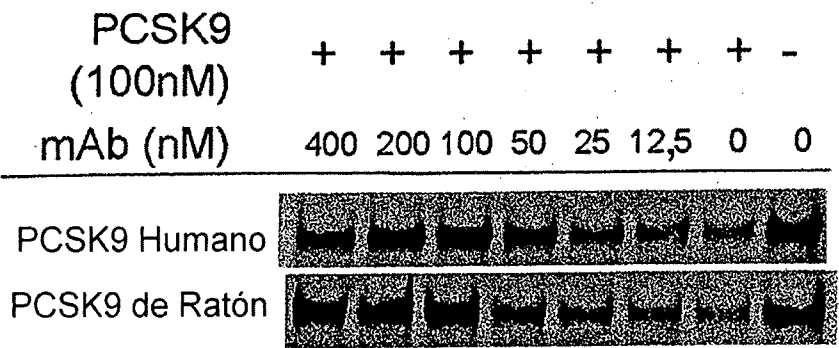


Figura 19

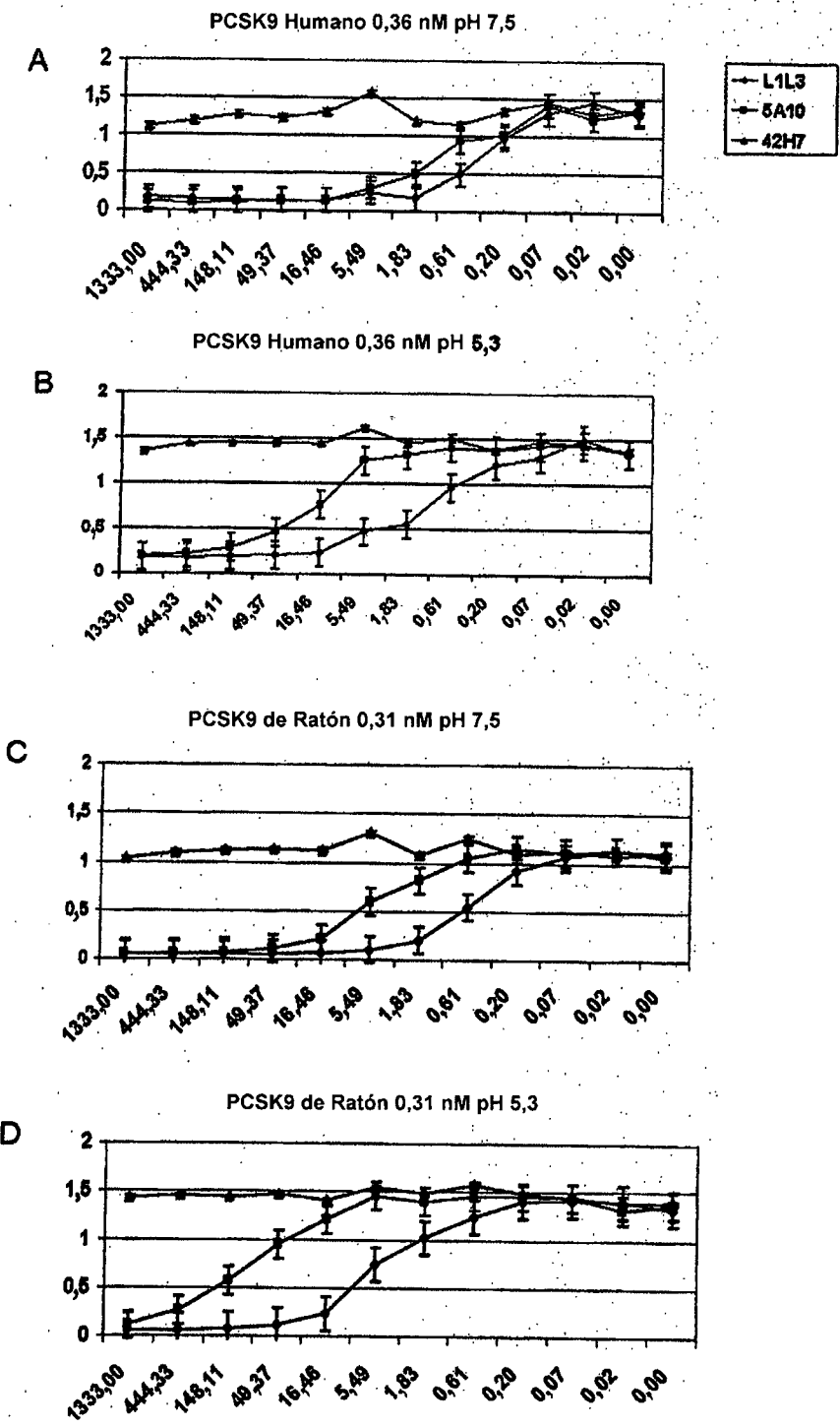


Figura 20

239
2/2

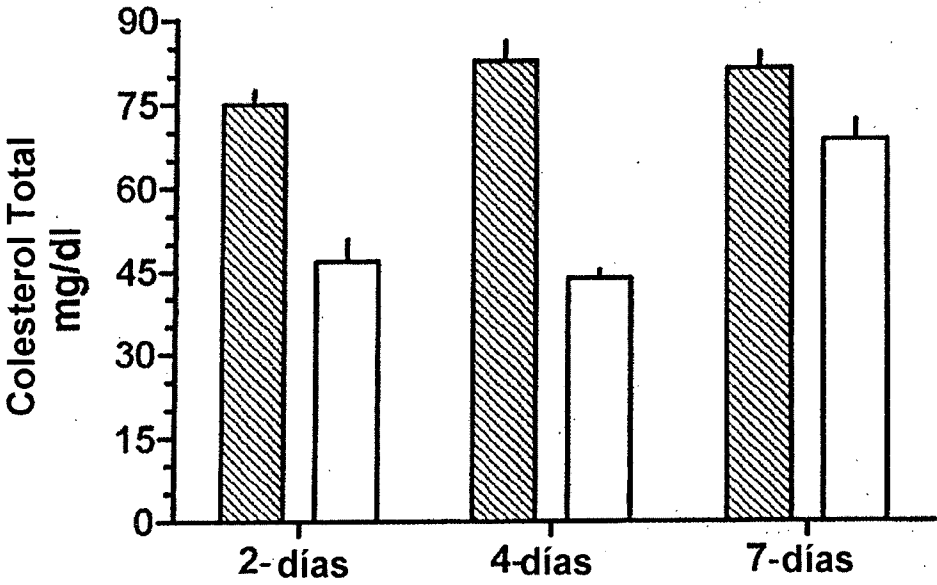


Figura 21

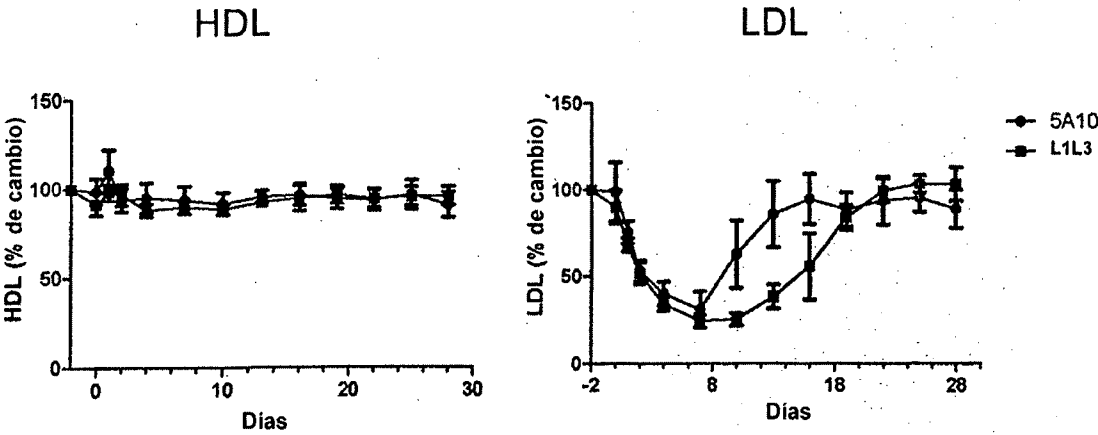


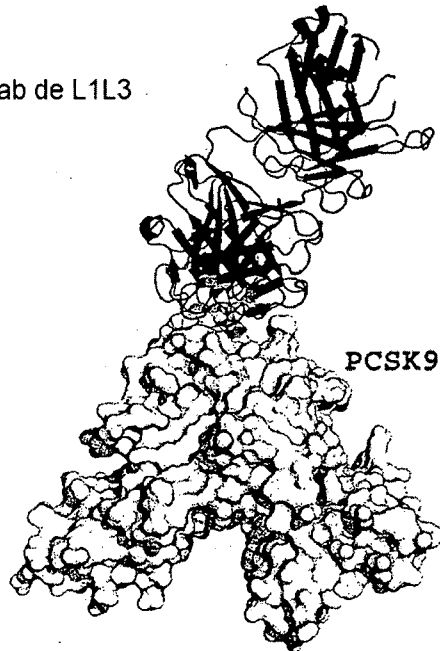
Figura 22

246
283

23 de 30

A

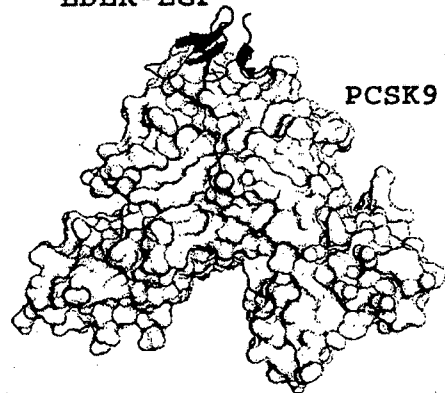
Fab de L1L3



B

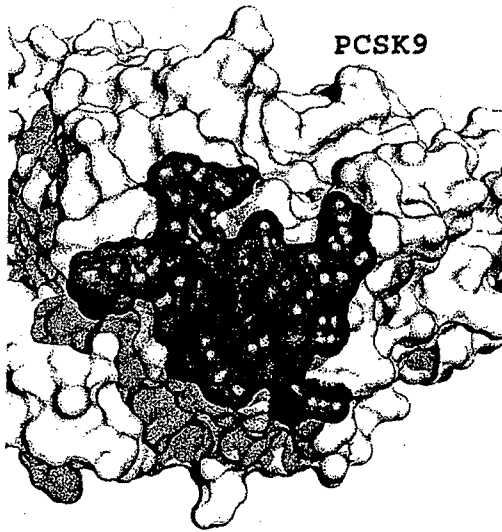
LDLR-EGF

PCSK9



C

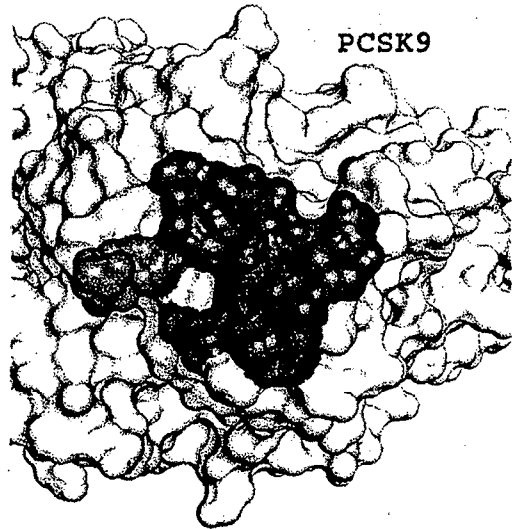
PCSK9



Epítipo de L1L3

D

PCSK9



Epítipo de EGF de LDLR

Figura 23

FIGURA 24A

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{on} [1/s]	K _D [pM]
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 57	EINPSNGRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 45		1100
QDVSTAVA 62							620000
GGTRVWSTAVA 63							
RGDFVSTAVA 64							
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 45	9x10 ⁻⁴	
				EINPSGGRTNYNEKFKS 65		1x10 ⁻³	
				EINPSSGRTNYNEKFKS 66		1x10 ⁻³	
				EINPSTGRTNYNEKFKS 67		1x10 ⁻³	
				EINPSIGRTNYNEKFKS 68		8x10 ⁻⁴	
				EINPSDSRTNYNEKFKS 69		1x10 ⁻³	
				EINPSGNRTNYNEKFKS 70		1x10 ⁻³	
				EINPSSSRTNYNEKFKS 71		1x10 ⁻³	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMMH 59	EINPSNGRTNYNEKFKS 44	ERPLYAMDY 72	9x10 ⁻⁴	
					ERPLYAADY 73	9x10 ⁻⁴	
					ERPLYAIDY 74	3x10 ⁻³	
					ERPLYARDY 75	5x10 ⁻³	
					ERPLYAGDY 76	1x10 ⁻³	
					ERPLYAKDY 77	1x10 ⁻³	
					ERPLYAPDY 78	7x10 ⁻³	
					ERPLYASDY 79	8x10 ⁻³	
					ERPLYALDY 80	1x10 ⁻³	
					ERPLYAVDY 81	2x10 ⁻³	
					ERPLYAWDY 82	2x10 ⁻³	
					ERPLYAHDY 83	9x10 ⁻³	

241
241

FIGURA 24B

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k_{off} [1/s]	K_D [pM]
					ERPLYAFDY 84	2×10^{-3}	
					ERPLYATDY 85	1×10^{-3}	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45	5×10^{-4}	
		QQRFPSTPRT 86				2×10^{-4}	
		QQRYSDWRT 87				5×10^{-4}	
		QQRYSsWRT 88				4×10^{-4}	
		QQRYSTART 89				7×10^{-4}	
		QQRYSLYRT 90				6×10^{-4}	
		QQRYSWLRT 13				4×10^{-4}	
		QQRYSFWRT 91				4×10^{-4}	
		QQRYSWPRT 92				4×10^{-4}	
		QQRYSGWRT 93				4×10^{-4}	
		QQRYSIWRT 94				4×10^{-4}	
		QQRYSAWRT 95				4×10^{-4}	
		QQRYSLFRT 96				4×10^{-4}	
		QQRYSTRTT 97				4×10^{-4}	
		QQRYSILYT 98				4×10^{-4}	
		QQRYSTWRT 99				5×10^{-4}	
		QQRYSLART 100				5×10^{-4}	
		QQRYSsERT 101				5×10^{-4}	
		QQRYSGTART 102				5×10^{-4}	
		QQRYSQART 103				5×10^{-4}	
		QQRYSLHRT 104				6×10^{-4}	

FIGURA 24C

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{on} [1/s]	K _D [pM]
		QQRYSQVRT 105				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSQSRT 106				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSAERT 107				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSQFRT 108				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSRRT 109				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSRST 110				3x10 ⁻⁴	
		QQRYSTNRR 111				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSRWRT 112				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSVRT 113				4x10 ⁻⁴	
		QQRYSWRT 114				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSGFRT 115				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSWRT 116				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSFKRT 117				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSARRT 118				5x10 ⁻⁴	
		QQRYSVRT 119				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSLQRT 120				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTSRT 121				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSART 122				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSKYRT 123				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSQSRT 124				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTAFT 125				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTCCT 126				6x10 ⁻⁴	
		QQRYSTDRT 127				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSERDT 128				7x10 ⁻⁴	

245
243

FIGURA 24D

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{on} [1/s]	K _o [pM]
		QQRVVGRT 129				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSLSRT 130				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSLGRT 131				7x10 ⁻⁴	
		QQRYSRART 132				8x10 ⁻⁴	
		QQRYSHART 133				8x10 ⁻⁴	
		QQRYSTPDT 134				9x10 ⁻⁴	
		QQRYYQQPRT 135				9x10 ⁻⁴	
KASQIDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 ⁻⁴	
				EIQVSGGRTNYNEKFS 136		9x10 ⁻⁴	
				EINPWQGGRTNYNEKFS 137		4x10 ⁻⁴	
				EINPVQGGRTNYNEKFS 138		6x10 ⁻⁴	
				EISPFGGRTNYNEKFS 9		2x10 ⁻⁴	
				EISPYGGRTNYNEKFS 139		3x10 ⁻⁴	
				EIQESGGRTNYNEKFS 140		3x10 ⁻⁴	
				EISPIGGRTNYNEKFS 141		4x10 ⁻⁴	
				EINPEHGGRTNYNEKFS 142		4x10 ⁻⁴	
				EINPSEGGRTNYNEKFS 143		4x10 ⁻⁴	
				EINPWMMGGRTNYNEKFS 144		5x10 ⁻⁴	
				EINPQGGRTNYNEKFS 145		5x10 ⁻⁴	
				EINPVKGGRTNYNEKFS 146		5x10 ⁻⁴	
				EIGPWGGRTNYNEKFS 147		5x10 ⁻⁴	
				EINPIGGRTNYNEKFS 148		6x10 ⁻⁴	
				EIQISGGRTNYNEKFS 149		7x10 ⁻⁴	

FIGURA 24E

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
				EINPQGTRTNYNEKFKS 150		8x10 ⁻⁴	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSCGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDS 151	2x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDR 152	2x10 ⁻⁴	
					ERPLYAMDR 153	2x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDA 154	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDV 155	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYAHDV 156	4x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDY 157	4x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDL 10	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDV 158	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDA 159	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDS 160	5x10 ⁻⁴	
					ERPLYATDL 161	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYASDS 162	6x10 ⁻⁴	
					ERPLYANDM 163	3x10 ⁻⁴	
					ERPLYAHDL 164	4x10 ⁻⁴	
					ERPLYAHDl 165	6x10 ⁻⁴	
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QCRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSCGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45		1470
					ERPLYANDV 166		342
					ERPLYASDY 167		755
					ERPLYASDL 10		343
					ERPLYASDR 168		271

243
246

FIGURA 24F

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _D [pM]
					ERPLYASDV 169		286
					ERPLYAHDV 170		385
					ERPLYANDM 171		413
					ERPLYAHDL 172		376
				EINPWQGRRTNYNEKFS 173			1390
				EINPVQGRRTNYNEKFS 174			439
				EISPYGGRRTNYNEKFS 175			216
				EISPFGRRTNYNEKFS 9			239
				EIGPWGGRRTNYNEKFS 176			363
		QQRYSWRT 177					616
		QQRYSWRT 178					728
		QQRYSART 179					345
		QQRYSLHRT 180					228
		QQRYSWLRT 13					94
		QQRYSSTRT 181					886
		QQRYSLQRT 182					497
		QQRYSSTRRT 183					297
							KD a 37C
		QQRYSWLRT 13		EISPFGRRTNYNEKFS 9			343
		QQRYSWLRT 13			ERPLYASDL 10		384
				EISPFGRRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		253
		QQRYSWLRT 13		EISPFGRRTNYNEKFS 9	ERPLYASDL 10		183
		QQRYSWRT 184			ERPLYASDL 10		466

FIGURA 24G

L1	L2	L3	H1	H2	H3	k _{off} [1/s]	K _o [pM]
					ERPLYASDL 10		703
							KD a 37C
				EISPFGGRTNYNEKFKS 9	ERPLYASDL 10		155
		QQRYSLWRT 13		EISPFGGRTNYNEKFKS 9	ERPLYASDL 10		79
				EISPYGGRTNYNEKFKS 185	ERPLYASDL 10		215
		QQRYSRRT 186			ERPLYASDL 10		621
					ERPLYASDL 10		968
KASQDVSTAVA 30	SASYRYT 12	QQRYSTPRT 31	GYTFTSYMH 59	EINPSGGRTNYNEKFKS 65	ERPLYAMDY 45		1470
RASQGISSALA 11							1660
	GASYLHS 186						9890
	DASNRAT 187						105000
RASQGISSALA 11	SASYRYT 12	QQRYSLWRT 13	GYTFTSYMH 59	EISPFGGRTNYNEKFKS 9	ERPLYASDL 10		7

247

247

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC33718A	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416																								
International application No. PCT/IB2009/053990	International filing date (day/month/year) 11.09.2009	Priority date (day/month/year) 12.09.2008																									
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/395																											
Applicant Rinat Neuroscience Corp.																											
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>2</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).																											
4. This report contains indications relating to the following items: <table style="width: 100%; border: none;"><tr><td style="width: 10%;">☒</td><td style="width: 15%;">Box No. I</td><td>Basis of the report</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. II</td><td>Priority</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. III</td><td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. IV</td><td>Lack of unity of invention</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. V</td><td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. VI</td><td>Certain documents cited</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. VII</td><td>Certain defects in the international application</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. VIII</td><td>Certain observations on the international application</td></tr></table>				☒	Box No. I	Basis of the report	☐	Box No. II	Priority	☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐	Box No. IV	Lack of unity of invention	☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☒	Box No. VI	Certain documents cited	☐	Box No. VII	Certain defects in the international application	☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒	Box No. I	Basis of the report																									
☐	Box No. II	Priority																									
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																									
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention																									
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																									
☒	Box No. VI	Certain documents cited																									
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application																									
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application																									
Date of submission of the demand 2010-02-12		Date of completion of this report 30.06.2010																									
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Hermann, Patrice Telephone No. +49 89 2399-7109																									

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2009/053990

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-65, 68-84 as originally filed

66, 67 filed with the letter of

12-02-2010

Claims, Numbers

1-24 as originally filed

Drawings, Sheets

1/30-30/30 as originally filed

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

248 245

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/B2009/053990

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>4-19, 23, 24</u>
	No: Claims	<u>1-3, 20-22</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>4-19, 23, 24</u>
	No: Claims	<u>1-3, 20-22</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-24</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rule 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

see separate sheet

Re Item I

Basis of the report

Sequence listing pages 1-51 are also included in the basis of this International Preliminary Examination Report.

Amended pages 66 and 67 of the description meet the requirements of Article 34 PCT and are also included in the basis of this International Preliminary Examination Report.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2008/057457 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15)
- D2 WO 2008/057458 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15)
- D3 WO 2008/057459 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15)
- D4 HORTON *et al.* - 'Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism' - 2007 - *Trends in Biochemical Sciences*, **32**: 71-77
- D5 LOPEZ Dayami - 'Inhibition of PCSK9 as a novel strategy for the treatment of hypercholesterolemia' - 2008 - *Drug News & Perspectives*, **21**: 323-330
- D6 LOPEZ Dayami - 'PCSK9: An enigmatic protease' - 2008 - *Biochimica and Biophysica Acta*, **1781**: 184-191
- D7 MCNUTT M. C. *et al.* - 'Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells' - 2009 - *Journal of Biological Chemistry*, **284**: 10561-10570

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2009/053990

- 2 Document D1 already discloses monoclonal antibodies able to inhibit the binding of PCSK9 to LDL-R and to dose-dependently inhibit in-vitro the effect of PCSK9 on LDL uptake (cf. D1 Example 5 and claims). In the absence of evidence to the contrary the said antibodies are also considered to implicitly i) lower the blood low density lipoprotein (LDL) cholesterol in a subject, ii) antagonize the PCSK9 mediated effect on LDL-R levels as measured in vitro using an LDL-R down-regulation assay in Huh7 cells. Document D1 further discloses the nucleic acid sequences encoding said antibodies and host cells producing the same (cf. D1 claims 22-24). The disclosure of D1 anticipates therefore the subject-matters of claims 1-3 and 20-22 contrary to the requirements of Article 33(1) and 33(2) PCT.
- 3 The same objection arises in view of the disclosure of D2 and D3 taken separately. Documents D2 and D3 are from the same applicant as D1 and describe the same antibodies as those reported in D1 (cf. D2 examples 5 and 6 and claims, and D3 examples 5 and 6 and claims).
- 4 In view of the prior-art documents at hand, dependent claims 4-19, 23 and 24 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step (Articles 33(1) and 33(3) PCT) since these additional features appear to be conventional and do not appear to result in any unexpected effect (Articles 33(1) and 33(3) PCT).
- For instance:
- Given the fact that PCSK9 is a protein well known in the art, and that its function linked to its binding with LDL-R leading to a lowering of LDL uptake in *in vitro* or *in vivo* models, is well documented (see for review D4 p. 75 paragraph entitled "PCSK9 as a therapeutic target" and "physiological role of PCSK9, D5 p. 327 - 328 paragraphs entitled "Need for PCSK9 inhibitors" and "Potential PCSK9 inhibitors"), it is considered routine in the art to develop and screen further monoclonal antibodies against PCSK9 and select those able to inhibit its interaction with LDL-R, especially when the amino acid implicated in said interaction and mechanism are well known in the art (cf. for review D6 p. 188-189 chapters 6-8), thereby to affect its influence on LDL uptake. The selection of further anti-PCSK9 antibodies as those contained in claims 5-17 and their incorporation in pharmaceutical preparation for therapeutic use such as that of claim 18, in the absence of an unexpected surprising technical effect over that

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2009/053990

already known or suggested in the prior art, cannot serve as a basis for inventive step acknowledgment contrary to the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.

- Similarly an inventive step for the cell line secreting the same antibodies humanized or rendered chimeric by molecule engineering such as those proposed in claims 23 and 24, appears not to be based on an inventive concept contrary to the requirements of Articles 33(1) and 33(3) PCT.
- It is also considered routine in the art to humanize or produce by molecular engineering chimeric antibodies from monoclonal antibodies directed against a well known protein (PCSK9), such as those already disclosed in D1, D2 or D3 (relevant for claim 4).
- The combination of inhibitors of PCSK9 and statins is already suggested in D5 (cf. D5 p. 328 the paragraph entitled "Conclusions": relevant for claim 19).

Re Item VI

Certain documents cited

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO-A-2009/055783	03.04.2009	27.10.2008	26.10.2007
WO-A-2008/133647	6.11.2008	2.11.2007	7.11.2006

Document D7 has been published between the priority date and the filing date of the application.

Those documents WO-A-2009/055783, WO-A-2008/133647, and D7 [P or E] cited in the international search report are not considered to be part of the prior art for the purposes of Article 33(2) and (3) PCT. However, should the present application enter the national or regional phase, and depending on the validity of the presently claimed priority, the above document/s could be relevant to the question of novelty [and inventive step].

- 66 -

above are prepared using one or more of the variable domains or CDR regions from a human PCSK9 antibody provided herein.

Generation of antigen-specific antibodies

- 5 More than 500 polyclonal and monoclonal antibodies raised against recombinant full-length human PCSK9, recombinant full length mouse PCSK9, and various synthetic peptides were evaluated for their ability to down regulate total LDLR protein in cultured Huh7 human liver cells. Among these antibodies were a set of antibodies raised to and reactive with a set of 12-20 amino acid residue polypeptides that, based on the structure
- 10 of PCSK9, were predicted to cover majority of the protein surface. At the highest concentration, the best antibodies exhibited only about 60% blocking activity.

- Thus, an alternative and heretofore unexplored approach was employed, namely, the generation of monoclonal antibodies by immunizing PCSK9 null mice with recombinant full-length PCSK9 protein. This manner of antibody preparation yielded
- 15 antagonist antibodies that show complete blocking of PCSK9 binding to LDLR, complete blocking of PCSK9-mediated lowering of LDLR levels in Huh7 cells, and lowering of LDLc in vivo including in mice to levels comparable to that seen in PCSK9 $-/-$ mice, as shown in Example 7.

- Representative antibodies (hybridomas) of the present invention were deposited
- 20 in the American Type Culture Collection (ATCC) on February 28, 2008, and were assigned the accession numbers in Table 3. Hybridomas were deposited for antibodies 4A5, 5A10, 6F6 and 7D4. DNA samples for the heavy and light chain variable regions of antibody L1L3 (Antibody designations RN316-PUC19-VH and RN316-PUC19-VL) were deposited in the ATCC on August 25, 2009 and were assigned the accession
- 25 numbers in Table 3.

- 67 -

Table 3

<u>Antibody Reference</u>	<u>ATCC Accession No.</u>	<u>Cell Line/Antibody Designation</u>
4A5	PTA-8985	LN15940
5A10	PTA-8986	LN15941
6F6	PTA-8984	LN15942
7D4	PTA-8983	LN15943
L1L3 Heavy chain variable	PTA-10302	RN316-PUC19-VH
L1L3 Light chain variable	PTA-10303	RN316-PUC19-VL

Examples

Example 1: Generating and Screening PCSK9 Antagonist Antibodies

5 General procedures for immunization of animals for generating monoclonal antibodies:

Balb/c or 129/bl6 pcsk9 $-/-$ mice were injected 5 times on a 13 day schedule with 100 μ g antigen. PCSK9 $-/-$ (that is, null or knock-out mice) can be obtained from, or as described by, Rashid et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102: 5374. See also U.S. Pat. No. 7,300,754. For the first 4 injections, antigen was prepared by mixing the recombinant proteins with adjuvant. Immunogen was given via injection to the scruff of the neck, the foot pads and intraperitoneally, approximately every 3 days over the course of 11 days, with the last boost administered i.v., without adjuvant. On Day 13, the mice were euthanized and their spleens were removed. Lymphocytes were immortalized by fusion with an established cell line to make hybridoma clones using standard hybridoma technology, distributed into 96 well plates. Clones were allowed to grow, then selected by ELISA screening using the immunizing antigen, as below.

ELISA screening of antibodies:

Supernatant media from growing hybridoma clones were screened separately for their ability to bind the recombinant human PCSK9 or recombinant mouse PCSK9. The assays were performed with 96-well plates coated overnight with 100 μ l of a 1 μ g/ml solution of one of the antigens. Excess reagents were washed from the wells between each step with PBS containing 0.05% Tween-20. Plates were then blocked with PBS containing 0.5% BSA. Supernatant was added to the plates and incubated at room

251

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

**RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

**Pfizer Global R&D
Groton Labs
Pfizer, Inc.
ATTN: Dr. Ing-Kae Wang
Eastern Point Road
Groton, CT 06340**

Date of Receipt of Culture by the ATCC®: February 28, 2008

ATCC® Patent Deposit Designation:

PTA-8983

The deposit was received by this International Depository Authority and has been accepted.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC® is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

We will inform you of requests for the strain for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested March 27, 2008 and on that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Dee Bishop, ATCC® Patent Depository

March 31, 2008
Date

Ref# PC33718

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Pfizer Inc
Attn: Dr. Ing-Kae Wang
Pfizer Global R&D
Groton Labs, MS 4092 Eastern Point Road
Groton, CT 06340

Deposited on Behalf of: Pfizer Inc

Date of Receipt of Cultures by the ATCC®: February 28, 2008

Identification Reference by Depositor:

ATCC® Patent Deposit Designation:

Mouse Hybridoma Cell line LN15942
Mouse Hybridoma Cell line LN15940

PTA-8984
PTA-8985

The deposits were received by this International Depository Authority and have been accepted.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC® is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

We will inform you of requests for the strains for 30 years from date of deposit.

The deposits were tested March 28, 2008 and on that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Latha Ramakrishnan

Digitally signed by Latha Ramakrishnan
DN: cn=Latha Ramakrishnan, o=ATCC, ou=IP,
email=Latha.Ramakrishnan@atcc.org, c=US
Date: 2008.04.04 11:20:27 -0400

ATCC® Patent Depository

April 4, 2008
Date

cc: Nicholas I. Slepchuk
Ref: Docket or Case No. PC33718

249
252

ATCC

AMENDED 7/15/2008

10801 University Boulevard • Manassas, VA 20110-2209 USA • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-334-2932

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2

To: (Name and Address of Depositor or Attorney)

Pfizer Global R&D
Groton Labs
Pfizer, Inc.
ATTN: Dr. Ing-Kae Wang
Eastern Point Road
Groton, CT 06340

Deposited on Behalf of: Pfizer, Inc. New York, New York

Date of Receipt of Culture by the ATCC®: February 28, 2008

Identification Reference by Depositor:

ATCC® Patent Deposit Designation:

Mouse hybridoma cell line: LN 15941

PTA-8986

The deposit was received by this International Depository Authority and has been accepted.

The strain will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strain, and ATCC® is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strain.

If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

We will inform you of requests for the strain for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested April 07, 2008 and on that date, the culture was viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Dee Bishop

Digitally signed by Dee Bishop
DN: cn=Dee Bishop, o=ATCC,
ou=IP, Licensing & Services,
email=patentdeposit@atcc.org,
c=US
Date: 2008.07.15 09:31:13 -0400

Dee Bishop, ATCC® Patent Depository

July 15, 2008

Date

**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

To:
Hong Liang
Pfizer, Inc
230 E Grand Ave
South San Francisco, CA 94080

Deposited on Behalf of: Pfizer, Inc

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: August 25, 2009

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	<u>Quantity Received:</u>
HAL103-VH: (Ig variable domain of heavy chain)	PTA-10300	28
HAL103-VK: (Ig variable domain of light chain)	PTA-10301	28
RN316-PUC19-VH: Heavy chain variable domain of an antibody cloned into bacteria vector PUC19	PTA-10302	27
RN316-PUC19-VL: Light chain variable domain of antibody cloned into bacteria vector PU19	PTA-10303	27

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

ATCC

A global bioscience nonprofit
organization dedicated to biological
standards and biodiversity

IP, Licensing and Services
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Telephone: (800) 638-6597
Facsimile: (703) 334-2932
Internet: <http://www.atcc.org>

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.

the deposit was tested on September 25, 2009 and on that date, the seeds/strain(s) were viable International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

Rochelle
Harrington

Digitally signed by Rochelle
Harrington
DN: cn=Rochelle Harrington,
o=ATCC, ou=PLS,
email=harrington@atcc.org, c=US
Location: Manassas, VA 20110
Date: 2009.09.25 15:11:37 -0400

ATCC® Patent Depository

September 25, 2009
Date

cc: Deborah Martin

Ref: Docket or Case No: PC33718

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 33718A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2009/053990	International filing date (day/month/year) 11/09/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 12/09/2008
Applicant RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2009/053990

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☒

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☒

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/053990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61P3/06 C07K16/40
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2009/055783 A2 (SCHERING CORP [US]; HEDRICK JOSEPH A [US]; MONSMA FREDERICK JAMES JR []) 30 April 2009 (2009-04-30) the whole document	1-24
A	GRAHAM MARK J ET AL: "Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice" JOURNAL OF LIPID RESEARCH, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD- DOI:10.1194/JLR.C600025-JLR200, vol. 48, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 763-767, XP002471923 ISSN: 0022-2275 [retrieved on 2007-01-22] the whole document	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 May 2010

Date of mailing of the international search report

01/06/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hermann, Patrice

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2009/053990

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRANK-KAMENETSKY MARIA ET AL: "Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US LNKD- DOI:10.1073/PNAS.0805434105, vol. 105, no. 33, 19 August 2008 (2008-08-19), pages 11915-11920, XP002534546 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-24
X	----- LOPEZ DAYAMI: "Inhibition of PCSK9 as a novel strategy for the treatment of hypercholesterolemia" DRUG NEWS & PERSPECTIVES 2008 JUL-AUG., vol. 21, no. 6, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 323-330, XP002522268 the whole document	1-24
A	----- HORTON ET AL: "Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism" TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB LNKD- DOI:10.1016/J.TIBS.2006.12.008, vol. 32, no. 2, 6 February 2007 (2007-02-06), pages 71-77, XP005876225 ISSN: 0968-0004 the whole document	1-24
A	----- WO 01/57081 A2 (MILLENNIUM PHARM INC [US]; CHIANG LILLIAN WEI MING [US]) 9 August 2001 (2001-08-09) the whole document	1-24
X	----- WO 2008/057459 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15) the whole document	1-24
X,P	----- WO 2008/133647 A2 (MERCK & CO INC [US]; SITLANI AYESHA [US]; SPARROW CARL P [US]; PANDIT) 6 November 2008 (2008-11-06) the whole document	1-24
X	----- WO 2008/057457 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15) the whole document	1-24
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2009/053990

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/057458 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15) the whole document	1-24
A	LOPEZ ET AL: "PCSK9: An enigmatic protease" BIOCHIMICA AND BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR AND CELL BIOLOGY OF LIPIDS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1781, no. 4, 2 February 2008 (2008-02-02), pages 184-191, XP022554055 ISSN: 1388-1981 the whole document	1-24
X,P	MCNUTT M. C. ET AL.: "Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 16, April 2009 (2009-04), pages 10561-10570, XP002580624 ISSN: 0021-9258 the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2009/053990

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009055783 A2	30-04-2009	NONE	
WO 0157081 A2	09-08-2001	AU 4146101 A CA 2399727 A1 EP 1257572 A2	14-08-2001 09-08-2001 20-11-2002
WO 2008057459 A2	15-05-2008	AU 2007322265 A1 CA 2667894 A1 CA 2669424 A1 EP 2083861 A2 EP 2083864 A2 US 2010041102 A1 WO 2008063382 A2	29-05-2008 15-05-2008 29-05-2008 05-08-2009 05-08-2009 18-02-2010 29-05-2008
WO 2008133647 A2	06-11-2008	CA 2667989 A1 EP 2106261 A2 US 2010040610 A1	06-11-2008 07-10-2009 18-02-2010
WO 2008057457 A2	15-05-2008	CA 2668131 A1 EP 2083859 A2 US 2010040611 A1	15-05-2008 05-08-2009 18-02-2010
WO 2008057458 A2	15-05-2008	CA 2667869 A1 EP 2083860 A2	15-05-2008 05-08-2009



No. 11-037695- -00000-0000

Fecha: 2011-03-28 16:54:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 256

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	11 037695
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/053990
	Fecha inicio fase nacional	12/04/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	008874

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

03 JUN. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	11 037695
	Solicitud internacional	PCT/IB2009/053990
	Fecha inicio fase nacional	12/04/2011
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	

008875

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11

03 JUN. 2011