



No. 12-116665-00000-0000

Fecha: 2012-07-11 16:21:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: ANTAGONISTAS DE PCSK9

SOLICITANTE: IRM LLC y NOVARTIS AG

DIRECCIÓN: 131 Front Street, P.O. Box HM 2899, Hamilton, HM LX Bermuda
y Lichtstrasse 35, CH- 4056 Basel, Suiza

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 11 de Julio de 2012

P2012/000076



PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000076

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: (1)IRM LLC y (2) NOVARTIS AG

Dirección: (1)131 Front Street, P.O. Box HM
2899, Hamilton, HM LX; (2) Lichtstrasse 35
CH-4056 Basel

Nacionalidad o Domicilio: (1) Bermuda;
(2) Suiza

Lugar de Constitución: (1) Bermuda;
(2) Suiza

Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. NIT

C.E. Otro

Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá D.C.

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. X NIT

C.E. Otro

Cual

Número 79782747 Bta
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/US2010/059959 Fecha Diciembre 10, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/072263 Fecha Junio 16, 2011

6

Título (54) ANTAGONISTAS DE PCSK9

Clasificación Internacional (51) C07K 16/40; A61K 39/395; A61P 3/06.

Prioridad		(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI	☒	NO	☐	
		US	Diciembre 11, 2009	61/285.942

9

Comprobante de pago No. 12-

Fecha Junio de 2012



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. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 09-044.589



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. 09-044.589



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



Declaraciones. Declaración bajo la regla 4.17 (ii) del PCT.



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.



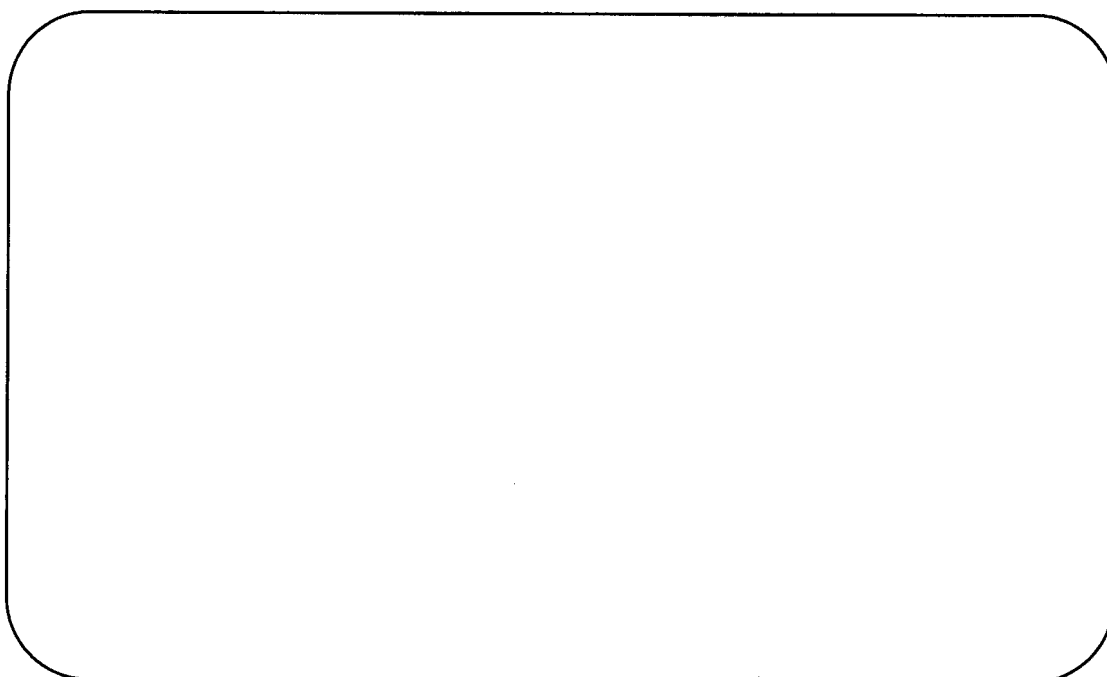
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional



FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2010/059959

Sarah RUE
4028 Carmel Springs Way,
San Diego, California 92130
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Steven B.COHEN
4104 Via Candidiz #89,
San Diego, California 92130
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

Jun LI
11618 Trailbrush Point,
San Diego, California 92126
United States of America
Nacionalidad: China

David YOWE
34 Fairview Avenue,
Belmont, Massachusetts 02478
United States of America
Nacionalidad: Estadounidense

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0064964	
				Bogotá D.C., Junio 27 de 2012 - 13:34:55	
RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS				NI 830.122.870	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455532560	25/06/2012	8.183.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
			=====		
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 12-116665- -00000-0000					
Fecha: 2012-07-11 16:21:48 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Junio 27 de 2012 - 13:35:09					

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha:	Recorrido:
Tipo de Radicación:		Entrada:	Salida:
		Traslado:	Convenio:
Radicador:		Planilla:	
ID	No. Radicación	Cons	Item
1			
2			
3	112-116665-0		
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Item	Unidad de Conservación
1	CD
2	Disquetes
3	DVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
7	Otros
8	Planos
9	Periódico
10	Publicación Periódica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
13	Sobre de manila

Observaciones

Anexo C.D



No. 12-116665- -00000-0000

Fecha: 2012-07-11 16:21:48 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	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 ☐



502

Se Exp. De
4/24
Copia
en 8
C/1
13-07-1
A

13-07-1

2

SE 617
25617

4,509
Gy12

8 HJ

18-07-11

9

0022-0466/00/0000-0000\$05.00/0

•

1

1

100

MONICA CLOUTIER, 1515 STANFORD AVE
NORWOOD, NH 03255-1111
NORWOOD, NH 03255-1111

-----HASTA AQUÍ LA MINUTA-----

SE ADVIRTIÓ al (a los) otorgante (s) de esta escritura de la **obligación que tiene (n) de leer la totalidad de su texto**, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados con el fin de aclarar, modificar o corregir lo que le(s) pareciere; la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto.-----

Se advierte igualmente la necesidad de diligenciar los espacios en blanco correspondientes a la información personal y de trabajo consignados en el espacio destinado para la firma de los suscriptores del instrumento publico, con el objeto de confrontar la información solicitada con el contenido de la escritura previo a la autorización de la misma. -----

En consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por error o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del (los) otorgante (s) y del notario. -----

En tal caso, de la existencia de estos, deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por el (los) que intervino (eron) en la inicial y sufragada por el (ellos) mismo (s). (Artículo 35 decreto ley 960 de 1.970).-----

ADVERTENCIA PARA TODOS LOS COMPARECIENTES QUE EXTIENDAN Y OTORGUEN INSTRUMENTOS, SEGÚN ART. 34 C.N., LEY 190 DE 1995, LEY 333 DE 1996 Y LEY 365 DE 1997. Los comparecientes bajo la gravedad del juramento manifiestan clara y expresamente que todos los dineros, bienes muebles e inmuebles contenidos en este instrumento fueron adquiridos por medios y actividades lícitas. Así como el dinero con el que se efectúa el pago de los gastos notariales.-----

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN. Leído el presente instrumento por el otorgante y advertido de la formalidad de Ley, estuvo de acuerdo con él lo aceptó en la forma como está redactado y en testimonio de que le da su asentimiento y aprobación lo firma por ante mí y conmigo el Notario que de todo lo expuesto doy fe lo autorizo.-----

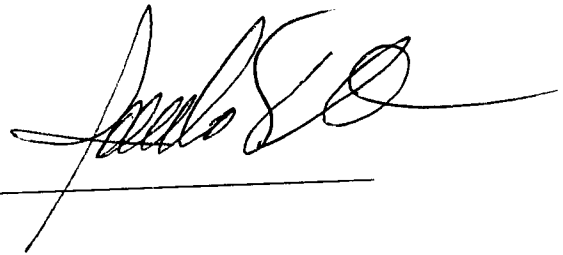
CONSTANCIA: El presente instrumento se extiende en la siguiente hoja de papel Notarial No. *****

7 700133 020793/ 020762/ - - - - -
- - - - -

NOTARIO PÚBLICO
ESTADO DE CALIFORNIA
Licencia No. 0041
Renovada: 1996

Este documento público es una traducción al español de un documento en idioma inglés
presentado ante mí.

ROBERTO M. OLARTE GARCÍA
Traductor e Intérprete Oficial
Ministerio de Justicia
Licencia 0041/1996



ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

La presente Apostilla solamente certifica la autenticidad de la firma y del cargo del funcionario público quien suscribió
este documento público, y, donde fuera el caso, la identidad del sello que llevara el documento público.

La presente Apostilla no certifica la autenticidad del documento anexo para lo cual fue otorgada.
La presente Apostilla no es válida en ningún sitio dentro de los Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.

Para verificar la veracidad de esta Apostilla, dirijase a www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
 2. Este documento público ha sido firmado por **Pamela M. Stone**
 3. actuando en calidad de **Notario Público, Estado de California**
 4. lleva el sello del **Pamela M. Stone, Notario Público, Estado de California**
- CERTIFICA
5. en Sacramento, California
 6. el **5 de julio de 2011**
 7. por Secretario de Estado encargado, Estado de California

8. **No. 30327**
9. Sello: (ilegible)
10. Firma: (ilegible)
Secretario de Estado
POR (firma ilegible)

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2011 JUL -8 A 10 01
JEFE DE LEGALIZACIONES
MEXICO D.F.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
080448
Cuya firma aparece en el
documento de este
no es responsable

080448
Roberto Olarte

MONICA ZUÑIGA
38

Poder General

Firma: (ilegible)

Nombre: Timothy L. Smith, J.D., Ph.D.
Firma autorizada y con poder para IRM LLC

Fecha: 15 de junio de 2011

Ciudad, País: San Diego, California, Estados Unidos de América



5002

RECONOCIMIENTO TODO-PROPÓSITO – CALIFORNIA

Estado de California
Condado de San Diego

El 15 de junio de 2011 ante mi, Pamela M. Stone, Notario Público, compareció Timothy L. Smith, quien con base en evidencia satisfactoria demostró ser la persona quien suscribió el anterior documento y reconoció que él firmó el mismo debidamente autorizado, y que mediante su firma sobre el instrumento, la persona o sociedad en nombre de quien actuó, suscribió dicho instrumento.

Certifico bajo sanción por perjurio según las leyes del Estado de California, que el anterior párrafo es verdadero y correcto.

En testimonio de lo cual, me suscribo y coloco el sello oficial.

Firma: (ilegible)

Sello:

PAMELA M. STONE
Comisión No. 1870231
Notario Público – California
Condado de San Diego
Mi comisión vence el 2 de noviembre de 2013

OPCIONAL

Aunque la información a continuación no es legalmente requerida, podrá ser útil para aquellas personas que dependan del documento y podría prevenir la remoción o re-adición fraudulenta de este formulario a otro documento.

Descripción del documento adjunto

Título o Tipo de Documento: Poder General – OlarteMoure y Asociados, Ltda.

Fecha del documento: 15 de junio de 2011

Número de páginas: 2



ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

La presente Apostilla solamente certifica la autenticidad de la firma y del cargo del funcionario público quien suscribió este documento público, y, donde fuera el caso, la identidad del sello que llevara el documento público.

La presente Apostilla no certifica la autenticidad del documento anexo para lo cual fue otorgada.

La presente Apostilla no es válida en ningún sitio dentro de los Estados Unidos de América, sus territorios o posesiones.

Para verificar la veracidad de esta Apostilla, dirijase a www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por **Pamela M. Stone**
3. actuando en calidad de **Notario Público, Estado de California**
4. lleva el sello del **Pamela M. Stone, Notario Público, Estado de California**

CERTIFICA

5. en Sacramento, California
6. el **5 de julio de 2011**
7. por Secretario de Estado encargado, Estado de California
8. **No. 30123**
9. Sello: (ilegible)
10. Firma: (ilegible)
Secretario de Estado
POR (firma ilegible)

602



OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

General Power of Attorney

Poder General

The undersigned,

Los suscritos,

IRM LLC

domiciled in

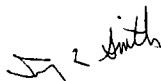
domiciliados en

131 Front Street, P.O. Box HM 2899, Hamilton HM LX, Bermuda.

hereby appoint to **Carlos R. Olarte** as legal representative with authority to appoint judicial or extrajudicial agents for matters related to **Patents for Inventions and Industrial Designs** in the Republics of Argentina, Belize, Bolivia, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Dominican Republic, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panama, Paraguay, Peru, Oriental Republic of Uruguay and the Bolivarian Republic of Venezuela, in order to initiate before any authorities all the necessary actions to accomplish these purposes and to intervene in all instances, steps and procedural levels; to file and prosecute applications, receive notifications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; 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 he may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte** como nuestro representante legal con facultades para nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales para asuntos de **Patentes de Invención y Diseños Industriales** en las Repúblicas de Argentina, Belice, Bolivia, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, República Oriental del Uruguay y la República Bolivariana de Venezuela, para iniciar ante cualquier autoridad todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, recibir notificaciones, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvencciones; formular 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 crea conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma:



Signature/Firma:

Name/Nombre: Timothy L. Smith, J.D., Ph.D.
Authorized Signatory and
Power of Attorney for IRM LLC

Name/Nombre:

6024

Date/Fecha: 15 June 2011

Date/Fecha:

City/Country/

Ciudad,País: San Diego, California, US

City/Country/

Ciudad,País:

Diagonal 34 No. 5 - 28 Bogotá D.C., Colombia.

Tel: + 57 (1) 601-7700 Fax: + 57 (1) 601-7799 e-mail: office@olartemoure.com
www.olartemoure.com

Notaría 28 de Bogotá

Certificación Notarial

En esta fecha
15 de junio de 2011

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
Timothy L. Smith

mayor de edad y domiciliado en
10675 John Jay Hopkins Drive
San Diego, California 92121, Estados Unidos de América

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
Firma Autorizada y con poder para IRM LLC

3. Que IRM LLC,
con sede principal ubicada en
131 Front Street, P.O. Box HM 2899,
Hamilton HM LX, Bermuda

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 está es
legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la
exhibición de los siguientes documentos auténticos:

Poder
de IRM LLC a Timothy Smith
suscrito el 10 de noviembre de 2010

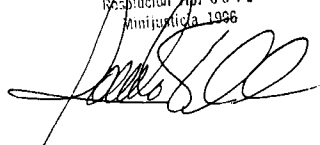
Certificado de constitución de IRM LLC
suscrito el 2 de junio de 1998

NOTARIO PÚBLICO (firma): ilegible
Pamela M. Stone, Notario Público

SELLO (opcional): PAMELA M. STONE
Comisión No. 1870231
Notario Público – California
Condado de San Diego

6024

ROBERTO M. OLARTE 1962-
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0041
Ministerio de Justicia 1996



State of California

SECRETARY OF STATE

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the title of the public official who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears. This Apostille does not certify the authenticity of the underlying document for which it was issued. This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions. To verify the issuance of this Apostille, go to www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Pamela M. Stone
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Pamela M. Stone, Notary Public, State of California
5. At Sacramento, California
6. the 5th day of July 2011
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 30327
9. Seal/Stamp:

10. Signature



Jana Bowen
Secretary of State

BY *Margie Jones*

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Diego

On June 15, 2011 before me, Pamela M. Stone, Notary Public
Date Here Insert Name and Title of the Officer

personally appeared Timothy L. Smith
Name(s) of Signer(s)

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument, the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.



Place Notary Seal and/or Stamp Above

Signature: Pamela M. Stone
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: General Power of Attorney - Martine Moore + Ascidos Ltd.

Document Date: June 15, 2011 Number of Pages: 2

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____ Signer's Name: _____

☐ Corporate Officer — Title(s): _____ ☐ Corporate Officer — Title(s): _____

☐ Individual ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General ☐ Individual ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General

☐ Attorney in Fact ☐ Attorney in Fact

☐ Trustee ☐ Trustee

☐ Guardian or Conservator ☐ Guardian or Conservator

☐ Other: _____ ☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____ Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here

RIGHT THUMBPRINT
OF SIGNER

Top of thumb here



State of California

SECRETARY OF STATE

This Apostille only certifies the authenticity of the signature and the title of the public official who has signed the public document, and, where appropriate, the identity of the seal or stamp which the public document bears. This Apostille does not certify the authenticity of the underlying document for which it was issued. This Apostille is not valid for use anywhere within the United States of America, its territories or possessions. To verify the issuance of this Apostille, go to www.sos.ca.gov/business/notary/apostille-search/

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by Pamela M. Stone
3. acting in the capacity of Notary Public, State of California
4. bears the seal/stamp of Pamela M. Stone, Notary Public, State of California
CERTIFIED
5. At Sacramento, California
6. the 5th day of July 2011
7. by Deputy Secretary of State, State of California
8. No. 30123
9. Seal/Stamp:



10. Signature

Jenna Bowen
Secretary of State

By *Margie Jones*



WONCA L. B. SALAS, Notary Public
No. 30123
JUL 11 2011
Sacramento, CA

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,
15 June 2011
The undersigned Notary Public certifies:
1. That
of legal age and domiciled in
signed the foregoing document.
2. That the grantor has executed the foregoing
document as
Authorized Signatory and Power of Attorney
for IRM LLC
3. That IRM LLC,
having its principal place of business located in
131 Front Street, P.O. Box HM 2899,
Hamilton HM LX, Bermuda
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.
4. That the grantor has the authority to execute the
General Power 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):

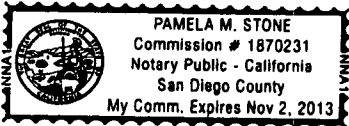
En esta fecha,
el Notario Público suscrito certifica:
1. Que
mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.
2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de
4. Que
con sede principal ubicada en
está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente 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
suscibir 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):



Power of Attorney
of IRM LLC to Timothy Smith
executed on 10 November 2010
Certificate of Formation of IRM LLC
executed on 02 June 1998

NOTARY PUBLIC (Signature):
SEAL (optional)

Signature line for Pamela M. Stone, Notary Public

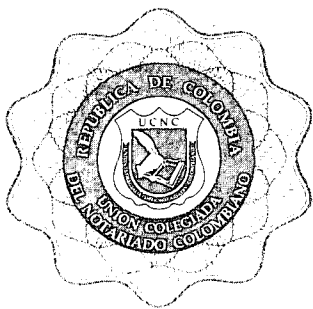


(See attached All-Purpose Acknowledgment)

6024



6024



FOLIO ANTERIOR

7 700133 020793-----

ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO:

SEIS MIL VEINTICUATRO (6024)-----

FECHA DE OTORGAMIENTO:

TRECE (13) DE JULIO DE DOS MIL ONCE (2011)-----

NOTARIA TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C. -----

RETENCION EN LA FUENTE. ARTICULO 20 Y 64 LEY 0075 DE 1986.\$ EXENTO ---

DERECHOS NOTARIALES.....\$ 44.000 - - - - -

SUPERINTENDENCIA.....\$3.700.00.-----

FONDO NACIONAL DEL NOTARIADO.....\$3.700.00.-----

IVA\$ 14.400- - - - -

DECRETO 1681 DE SEPTIEMBRE 16 DE 1996 Y RESOLUCION 11621 DE
DICIEMBRE 22 DE 2010 Y MODIFICADA POR LA RESOLUCION 11903 DE
DICIEMBRE 30 DE 2010. -----


CARLOS REINALDO OLARTE



C.C.

DIRECCIÓN RESIDENCIA:

DIRECCIÓN OFICINA:

TELÉFONO RESIDENCIA:

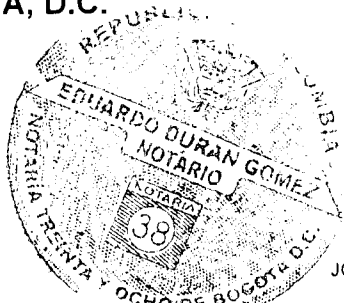
TELÉFONO OFICINA:

CELULAR:

ESTADO CIVIL:

EL NOTARIO TREINTA Y OCHO (38)
DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ, D.C.


EDUARDO DURAN GOMEZ



JOHANNA V

201106136-PROTOCOLIZACIONES


Z. J. HDEZ



CONFIDENTIAL

4

CONFIDENTIAL

2

ES LA COPIA (**FOTOCOPIA**) NÚMERO =4= DE LA
ESCRITURA PÚBLICA =6024= FECHA =13= DE =JULIO=
DEL AÑO =2011= TOMADA DE SU ORIGINAL QUE SE
EXPIDE CONFORME AL ARTÍCULO DEL DECRETO 2148
DE 1983, EN =7= HOJAS ÚTILES CON DESTINO AL
= INTERESADO=

DADO EN BOGOTA, D.C. 02 DE SEPTIEMBRE DE 2011

MONICA ZULMA BAZTISTA NAVARRO
NOTARIA (38E) DEL CIRCULO DE BOGOTA



Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.



4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.



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

Certificación:

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

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

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) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346



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

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

NOVARTIS AG

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right 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, recourses, 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.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual 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, recursos, 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.

Signature/Firma:

Date/Fecha: June 27, 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland


Arthur Canonica


Pascal Traub

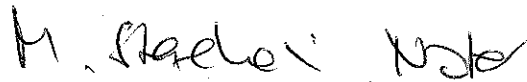
Attestation

- 1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of **Mr. Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.
- 2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.
- 3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, 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 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)



Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven),
2009 (two thousand and nine).

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *P. in*

3. in his/her function as *St. Stettelin*

4. and certified by the seal of the *St. Stettelin*

Certified 20. Aug. 2006

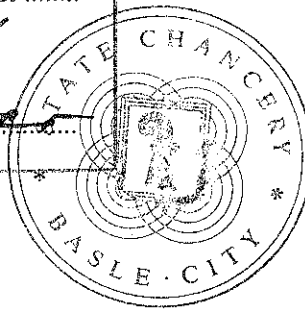
5. in Basel (Bâle) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. *2009/18584*

9. Seal / stamp: 10. Signature: *Fischer*

Heidi Fischer





(51) International Patent Classification:
C07K 16/40 (2006.01) **A61P 3/06** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/059959

(22) International Filing Date:
10 December 2010 (10.12.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/285,942 11 December 2009 (11.12.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **IRM LLC** [US/—]; 131 Front Street, Hamilton, HM LX (BM). **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RUE, Sarah** [US/US]; 4028 Carmel Springs Way, San Diego, California 92130 (US). **COHEN, Steven, B.** [US/US]; 4104 Via Candidiz #89, San Diego, California 92130 (US). **LI, Jun** [CN/US]; 11618 Trailbrush Point, San Diego, California 92126 (US). **YOWE, David** [US/US]; 34 Fairview Avenue, Belmont, Massachusetts 02478 (US).

(74) Agents: **SMITH, Timothy, L.** et al.; Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, California 92121 (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, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, 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, RS, 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 applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: PCSK9 ANTAGONISTS

(57) Abstract: The present disclosure provides antibody antagonists against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a ("PCSK9") and methods of using such antibodies.



PCSK9 ANTAGONISTS

CROSS-REFERENCE TO RELATED PATENT APPLICATIONS

- [0001] The present invention claims benefit of priority to US Provisional Patent Application No. 61/285,942, filed December 11, 2009, which is incorporated by reference for all purposes.

FIELD OF THE INVENTION

- [0002] The present invention relates to antibody antagonists against PCSK9.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- 10 [0003] The low-density lipoprotein receptor (LDL-R) prevents atherosclerosis and hypercholesterolemia through the clearance of the low-density lipoproteins (LDL) in the bloodstream. LDL-R is regulated at the posttranslational level by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a ("PCSK9"). Recently, the knockout of PCSK9 was reported in mice. These mice showed an approximate 50% reduction in the plasma cholesterol levels and
15 showed enhanced sensitivity to statins in reducing plasma cholesterol (Rashid S, *et al* (2005) *Proc Natl Acad Sci* 102:5374-5379. Human genetic data also support the role of PCSK9 in LDL homeostasis. Two mutations were recently identified that are presumably "loss-of-function" mutations in PCSK9. The individuals with these mutations have an approximately 40% reduction in the plasma levels of LDL-C which translates into an approximate 50-90%
20 decrease in coronary heart disease. Taken together, these studies indicate that an inhibitor of PCSK9 would be beneficial for lowering plasma concentrations of LDL-C and other disease conditions mediated by PCSK9 and could be co-administered, *e.g.*, with a second agent useful for lowering cholesterol for increased efficacy.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

- 25 [0004] The present invention provides antibodies that bind to and antagonize the function of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) (*e.g.*, SEQ ID NO:47), and methods for using such antibodies, *e.g.*, to treat disease conditions mediated by PCSK9.

[0005] In one aspect, the invention provides antibodies and antigen binding molecules that bind to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). In some embodiments, the antibody:

a) does not block PCSK9 binding to the low density lipoprotein receptor (LDLR)

5 and

b) inhibits PCSK9-mediated degradation of LDLR.

[0006] In some embodiments, the antibody or antigen binding molecule binds to at least one amino acid within residue positions 680-692 of human PCSK9. For example, in some embodiments, the antibody or antigen binding molecule binds to an epitope of PCSK9 within
10 the amino acid sequence RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:49).

[0007] In some embodiments, the antibody or antigen binding molecule binds to human PCSK9 with an equilibrium dissociation constant (KD) of about 500 pM or less. For example, in some embodiments, the antibody or antigen binding molecule binds to human PCSK9 with an equilibrium dissociation constant (KD) of about 400 pM, 300 pM, 250 pM,
15 200 pM, 190 pM, 180 pM, 170 pM, 160 pM, 150 pM, 140 pM, or less.

[0008] In some embodiments, the antibody or antigen binding molecule has an *in vivo* half-life of at least about 7 days. In some embodiments the antibody or antigen binding molecule has an *in vivo* half-life of at least about 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 days. In some embodiments, the antibody or antigen binding molecule has an *in vivo* cholesterol lowering effect of at least
20 about 2 weeks, for example, 2, 3, 4 weeks or longer. Preferably, the *in vivo* half-life is determined in a human subject.

[0009] In some embodiments, the antibody comprises

(a) a heavy chain variable region comprising a human heavy chain V-segment, a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3), and a heavy chain framework
25 region 4 (FR4), and

(b) a light chain variable region comprising a human light chain V segment, a light chain CDR3, and a light chain FR4, wherein

i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence
SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14); and

30 ii) the light chain CDR3 variable region comprises the amino acid sequence
LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

[0010] In some embodiments, the antibody comprises

(a) a heavy chain variable region comprising a human heavy chain V-segment, a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3), and a heavy chain framework region 4 (FR4), and

(b) a light chain variable region comprising a human light chain V segment, a light chain CDR3, and a light chain FR4, wherein

i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence SYYYYNMDY (SEQ ID NO:12); and

ii) the light chain CDR3 variable region comprises the amino acid sequence LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

10 **[0011]** In some embodiments, the antibody comprises

(a) a heavy chain variable region comprising a human heavy chain V-segment, a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3), and a heavy chain framework region 4 (FR4), and

(b) a light chain variable region comprising a human light chain V segment, a light chain CDR3, and a light chain FR4, wherein

i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence SYYYIAMDY (SEQ ID NO:13); and

ii) the light chain CDR3 variable region comprises the amino acid sequence LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

20 **[0012]** In some embodiments, the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13; and the light chain CDR3 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

[0013] In some embodiments, the heavy chain V-segment has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to SEQ ID

25 NO:28, and wherein the light chain V segment has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to SEQ ID NO:31.

[0014] In some embodiments, the heavy chain V-segment has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to SEQ ID

30 NO:27, and wherein the light chain V segment has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to the amino acid selected from the group consisting of SEQ ID NO:29 and SEQ ID NO:30.

[0015] In some embodiments, the heavy chain FR4 is a human germline FR4. In some embodiments, the heavy chain FR4 is SEQ ID NO:35.

[0016] In some embodiments, the light chain FR4 is a human germline FR4. In some embodiments, the light chain FR4 is SEQ ID NO:39.

[0017] In some embodiments, the heavy chain V-segment and the light chain V-segment each comprise a complementarity determining region 1 (CDR1) and a complementarity determining region 2 (CDR2); wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:8;

ii) the CDR2 of the heavy chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:11;

iii) the CDR1 of the light chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:22; and

iv) the CDR2 of the light chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:25.

[0018] In some embodiments, the heavy chain V-segment and the light chain V-segment each comprise a complementarity determining region 1 (CDR1) and a complementarity determining region 2 (CDR2); wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:7;

ii) the CDR2 of the heavy chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:10;

iii) the CDR1 of the light chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:21; and

iv) the CDR2 of the light chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:24.

[0019] In some embodiments,

i) the CDR1 of the heavy chain V-segment comprises SEQ ID NO:7;

ii) the CDR2 of the heavy chain V-segment comprises SEQ ID NO:10;

iii) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13;

iv) the CDR1 of the light chain V-segment comprises SEQ ID NO:21;

v) the CDR2 of the light chain V-segment comprises SEQ ID NO:24; and

vi) the light chain CDR3 comprises SEQ ID NO:26.

[0020] In some embodiments, the heavy chain variable region has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity to the variable region of SEQ ID NO:40 and the light chain variable region has at least 90% amino acid sequence identity to the variable region of SEQ ID NO:41.

5 [0021] In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:40 and a light chain comprising SEQ ID NO:41.

[0022] In some embodiments, the heavy chain variable region has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity to the variable region selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4
10 and the light chain variable region has at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% amino acid sequence identity to the variable region selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:18.

[0023] In some embodiments, the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4 and the light
15 chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:18.

[0024] In some embodiments, the antibody is an IgG. In some embodiments, the antibody is an IgG1. In some embodiments, the antibody has a heavy chain sharing at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to an
20 amino acid selected from the group consisting of SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:5. In some embodiments, the antibody has a light chain sharing at least 85%, 88%, 89%, 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity to an amino acid selected from the group consisting of SEQ ID NO:17 and SEQ ID NO:19.

[0025] In some embodiments, the antibody is a FAb' fragment. In some embodiments, the
25 antibody is a single chain antibody (scFv). In some embodiments, the antibody comprises human constant regions. In some embodiments, the antibody comprises a human IgG1 constant region. In some embodiments, the human IgG1 constant region is mutated to have reduced binding affinity for an effector ligand such as Fc receptor (FcR), *e.g.*, Fc gamma R1, on a cell or the C1 component of complement. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,624,821. In some
30 embodiments, amino acid residues L234 and L235 of the IgG1 constant region are substituted to Ala234 and Ala235. The numbering of the residues in the heavy chain constant region is that of the EU index (*see*, Kabat, et al., (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Dept. Health and Human Services).

[0026] In some embodiments, the antibody is linked to a carrier protein, for example, albumin.

[0027] In some embodiments, the antibody is PEGylated.

[0028] In a related aspect, the invention provides antibodies that bind to PCSK9, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein the heavy chain variable region and the light chain variable region each comprise the following three complementarity determining regions (CDRs): CDR1, CDR2 and CDR3; wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:8;

ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:11;

iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:14;

iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:22;

v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:25;

vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

[0029] In some embodiments,

i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7;

ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:10;

iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13;

iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:21;

v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:23 and SEQ ID NO:24;

vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

[0030] In a related aspect, the invention provides antibodies that bind to PCSK9, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein the heavy chain variable region and the light chain variable region each comprise the following three complementarity determining regions (CDRs): CDR1, CDR2 and CDR3;

5 wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:6;

ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:9;

10 iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:13;

iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:20;

15 v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:23;

vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

[0031] In a related aspect, the invention provides antibodies that bind to PCSK9, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein the heavy chain variable region and the light chain variable region each comprise the following three complementarity determining regions (CDRs): CDR1, CDR2 and CDR3; wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:7;

25 ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:10;

iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:12;

30 iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:21;

v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:24;

vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

[0032] In a related aspect, the invention provides antibodies that bind to PCSK9, wherein the antibody comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein the heavy chain variable region and the light chain variable region each comprise the following three complementarity determining regions (CDRs): CDR1, CDR2 and CDR3;

5 wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:7;

ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:10;

10 iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:13;

iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:21;

15 v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:24;

vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

[0033] In a further aspect, the invention provides compositions comprising an antibody or antigen binding molecule as described herein and a physiologically compatible excipient.

20 [0034] In some embodiments, the composition further comprises a second agent that reduces low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels in an individual.

[0035] In some embodiments, the second agent is a statin. For example, the statin can be selected from the group consisting of atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.

25 [0036] In some embodiments, the second agent is selected from the group consisting of fibrates, niacin and analogs thereof, a cholesterol absorption inhibitor, a bile acid sequestrant, a thyroid hormone mimetic, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor, a diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an inhibitory nucleic acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100.

30 [0037] In a further aspect, the invention provides methods of reducing LDL-C, non-HDL-C and/or total cholesterol in an individual in need thereof, the method comprising administering a therapeutically effective amount to the individual an antibody or antigen binding molecule as described herein.

[0038] In some embodiments, the individual is hyporesponsive or resistant to statin therapy. In some embodiments, the individual is intolerant to statin therapy. In some embodiments, the individual has a baseline LDL-C level of at least about 100 mg/dL, for example, at least about 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 mg/dL, or higher. In some embodiments, the individual has familial hypercholesterolemia. In some embodiments, the individual has triglyceridemia. In some embodiments, the individual has a gain-of-function PCSK9 gene mutation. In some embodiments, the individual has drug-induced dyslipidemia.

[0039] In some embodiments, total cholesterol is reduced with LDL-C.

[0040] In some embodiments, the methods further comprise administering a therapeutically effective amount of a second agent effective in reducing LDL-C to the individual.

[0041] In some embodiments, the second agent is a statin. For example, the statin can be selected from the group consisting of atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.

[0042] In some embodiments, the second agent is selected from the group consisting of fibrates, niacin and analogs thereof, cholesterol absorption inhibitors, bile acid sequestrants, thyroid hormone mimetics, a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor, a diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an inhibitory nucleic acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100.

[0043] In some embodiments, the antibody or antigen binding molecule and the second agent are co-administered as a mixture.

[0044] In some embodiments, the antibody or antigen binding molecule and the second agent are co-administered separately.

[0045] In some embodiments the antibody is administered intravenously. In some embodiments, the antibody is administered subcutaneously.

DEFINITIONS

[0046] An “antibody” refers to a polypeptide of the immunoglobulin family or a polypeptide comprising fragments of an immunoglobulin that is capable of noncovalently, reversibly, and in a specific manner binding a corresponding antigen. An exemplary antibody structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one “light” (about 25 kD) and one “heavy”

chain (about 50-70 kD), connected through a disulfide bond. The recognized immunoglobulin genes include the κ , λ , α , γ , δ , ϵ , and μ constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either κ or λ . Heavy chains are classified as γ , μ , α , δ , or ϵ , which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, respectively. The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms variable light chain (V_L) and variable heavy chain (V_H) refer to these regions of light and heavy chains respectively. As used in this application, an "antibody" encompasses all variations of antibody and fragments thereof that possess a particular binding specificity, *e.g.*, for PCSK9. Thus, within the scope of this concept are full length antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, single chain antibodies (ScFv), Fab, Fab', and multimeric versions of these fragments (*e.g.*, $F(ab')_2$) with the same binding specificity.

[0047] "Complementarity-determining domains" or "complementarity-determining regions ("CDRs") interchangeably refer to the hypervariable regions of V_L and V_H . The CDRs are the target protein-binding site of the antibody chains that harbors specificity for such target protein. There are three CDRs (CDR1-3, numbered sequentially from the N-terminus) in each human V_L or V_H , constituting about 15-20% of the variable domains. The CDRs are structurally complementary to the epitope of the target protein and are thus directly responsible for the binding specificity. The remaining stretches of the V_L or V_H , the so-called framework regions, exhibit less variation in amino acid sequence (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0048] The positions of the CDRs and framework regions are determined using various well known definitions in the art, *e.g.*, Kabat, Chothia, international ImMunoGeneTics database (IMGT) (on the worldwide web at imgt.cines.fr/), and AbM (see, *e.g.*, Johnson *et al.*, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, Nature, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997)). Definitions of antigen combining sites are also described in the following: Ruiz *et al.*, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000); and Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996); and Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989); Martin *et al.*, Methods Enzymol., 203:121-153 (1991); and Rees *et al.*, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

[0049] The term “binding specificity determinant” or “BSD” interchangeably refer to the minimum contiguous or non-contiguous amino acid sequence within a complementarity determining region necessary for determining the binding specificity of an antibody. A minimum binding specificity determinant can be within one or more CDR sequences. In some embodiments, the minimum binding specificity determinants reside within (*i.e.*, are determined solely by) a portion or the full-length of the CDR3 sequences of the heavy and light chains of the antibody.

[0050] An “antibody light chain” or an “antibody heavy chain” as used herein refers to a polypeptide comprising the V_L or V_H , respectively. The endogenous V_L is encoded by the gene segments V (variable) and J (junctional), and the endogenous V_H by V, D (diversity), and J. Each of V_L or V_H includes the CDRs as well as the framework regions. In this application, antibody light chains and/or antibody heavy chains may, from time to time, be collectively referred to as “antibody chains.” These terms encompass antibody chains containing mutations that do not disrupt the basic structure of V_L or V_H , as one skilled in the art will readily recognize.

[0051] Antibodies exist as intact immunoglobulins or as a number of well-characterized fragments produced by digestion with various peptidases. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce $F(ab)'_2$, a dimer of Fab' which itself is a light chain joined to V_H - C_H1 by a disulfide bond. The $F(ab)'_2$ may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region, thereby converting the $F(ab)'_2$ dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially Fab with part of the hinge region. Paul, *Fundamental Immunology* 3d ed. (1993). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, one of skill will appreciate that such fragments may be synthesized *de novo* either chemically or by using recombinant DNA methodology. Thus, the term “antibody,” as used herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies, or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies (*e.g.*, single chain Fv) or those identified using phage display libraries (see, *e.g.*, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990)).

[0052] For preparation of monoclonal or polyclonal antibodies, any technique known in the art can be used (see, *e.g.*, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Techniques for the production of single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778) can be adapted to produce antibodies to polypeptides of this

invention. Also, transgenic mice, or other organisms such as other mammals, may be used to express humanized antibodies. Alternatively, phage display technology can be used to identify antibodies and heteromeric Fab fragments that specifically bind to selected antigens (see, *e.g.*, McCafferty *et al.*, *supra*; Marks *et al.*, *Biotechnology*, 10:779-783, (1992)).

5 [0053] Methods for humanizing or primatizing non-human antibodies are well known in the art. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as import residues, which are typically taken from an import variable domain.

Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers

10 (*see, e.g.*, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding

sequences of a human antibody. Accordingly, such humanized antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567), wherein substantially less than an intact human

15 variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some complementarity determining region ("CDR") residues and possibly some framework ("FR") residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

[0054] A "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region, or a
20 portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, *e.g.*, an enzyme, toxin, hormone, growth factor, and drug; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a
25 different or altered antigen specificity.

[0055] Antibodies or antigen-binding molecules of the invention further includes one or more immunoglobulin chains that are chemically conjugated to, or expressed as, fusion proteins with other proteins. It also includes bispecific antibody. A bispecific or bifunctional antibody is an artificial hybrid antibody having two different heavy/light chain pairs and two
30 different binding sites. Other antigen-binding fragments or antibody portions of the invention include bivalent scFv (diabody), bispecific scFv antibodies where the antibody molecule recognizes two different epitopes, single binding domains (dAbs), and minibodies.

[0056] The various antibodies or antigen-binding fragments described herein can be produced by enzymatic or chemical modification of the intact antibodies, or synthesized de novo using recombinant DNA methodologies (e.g., single chain Fv), or identified using phage display libraries (see, e.g., McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990). For example, minibodies can be generated using methods described in the art, e.g., Vaughan and Sollazzo, Comb Chem High Throughput Screen. 4:417-30 2001. Bispecific antibodies can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, e.g., Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992). Single chain antibodies can be identified using phage display libraries or ribosome display libraries, gene shuffled libraries. Such libraries can be constructed from synthetic, semi-synthetic or native and immunocompetent sources.

[0057] A "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, e.g., an enzyme, toxin, hormone, growth factor, drug, etc.; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a different or altered antigen specificity. For example, as shown in the Examples below, a mouse anti-PCSK9 antibody can be modified by replacing its constant region with the constant region from a human immunoglobulin. Due to the replacement with a human constant region, the chimeric antibody can retain its specificity in recognizing human PCSK9 while having reduced antigenicity in human as compared to the original mouse antibody.

[0058] The term "antibody binding molecule" or "non-antibody ligand" refers to antibody mimics that use non-immunoglobulin protein scaffolds, including adnectins, avimers, single chain polypeptide binding molecules, and antibody-like binding peptidomimetics.

[0059] The term "variable region" or "V-region" interchangeably refer to a heavy or light chain comprising FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. See, Figure 1. An endogenous variable region is encoded by immunoglobulin heavy chain V-D-J genes or light chain V-J genes. A V-region can be naturally occurring, recombinant or synthetic.

[0060] As used herein, the term "variable segment" or "V-segment" interchangeably refer to a subsequence of the variable region including FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3. See,

Figure 1. An endogenous V-segment is encoded by an immunoglobulin V-gene. A V-segment can be naturally occurring, recombinant or synthetic.

[0061] As used herein, the term “J-segment” refers to a subsequence of the variable region encoded comprising a C-terminal portion of a CDR3 and the FR4. An endogenous J-segment is encoded by an immunoglobulin J-gene. *See*, Figure 1. A J-segment can be naturally occurring, recombinant or synthetic.

[0062] A “humanized” antibody is an antibody that retains the reactivity of a non-human antibody while being less immunogenic in humans. This can be achieved, for instance, by retaining the non-human CDR regions and replacing the remaining parts of the antibody with their human counterparts. *See, e.g.*, Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

[0063] The term “corresponding human germline sequence” refers to the nucleic acid sequence encoding a human variable region amino acid sequence or subsequence that shares the highest determined amino acid sequence identity with a reference variable region amino acid sequence or subsequence in comparison to all other all other known variable region amino acid sequences encoded by human germline immunoglobulin variable region sequences. The corresponding human germline sequence can also refer to the human variable region amino acid sequence or subsequence with the highest amino acid sequence identity with a reference variable region amino acid sequence or subsequence in comparison to all other evaluated variable region amino acid sequences. The corresponding human germline sequence can be framework regions only, complementarity determining regions only, framework and complementarity determining regions, a variable segment (as defined above), or other combinations of sequences or subsequences that comprise a variable region. Sequence identity can be determined using the methods described herein, for example, aligning two sequences using BLAST, ALIGN, or another alignment algorithm known in the art. The corresponding human germline nucleic acid or amino acid sequence can have at least about 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% sequence identity with the reference variable region nucleic acid or amino acid sequence. Corresponding human germline sequences can be determined, for example, through the publicly available international ImMunoGeneTics database (IMGT) (on the worldwide web at imgt.cines.fr/) and V-base (on the worldwide web at vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

[0064] The phrase “specifically (or selectively) bind,” when used in the context of describing the interaction between an antigen, *e.g.*, a protein, to an antibody or antibody-derived binding agent, refers to a binding reaction that is determinative of the presence of the antigen in a heterogeneous population of proteins and other biologics, *e.g.*, in a biological sample, *e.g.*, a blood, serum, plasma or tissue sample. Thus, under designated immunoassay conditions, the antibodies or binding agents with a particular binding specificity bind to a particular antigen at least two times the background and do not substantially bind in a significant amount to other antigens present in the sample. Specific binding to an antibody or binding agent under such conditions may require the antibody or agent to have been selected for its specificity for a particular protein. As desired or appropriate, this selection may be achieved by subtracting out antibodies that cross-react with, *e.g.*, PCSK9 molecules from other species (*e.g.*, mouse) or other PCSK subtypes. A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select antibodies specifically immunoreactive with a protein (see, *e.g.*, Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity). Typically a specific or selective binding reaction will produce a signal at least twice over the background signal and more typically at least than 10 to 100 times over the background.

[0065] The term “equilibrium dissociation constant (K_D , M)” refers to the dissociation rate constant (k_d , time^{-1}) divided by the association rate constant (k_a , time^{-1} , M^{-1}). Equilibrium dissociation constants can be measured using any known method in the art. The antibodies of the present invention generally will have an equilibrium dissociation constant of less than about 10^{-7} or 10^{-8} M, for example, less than about 10^{-9} M or 10^{-10} M, in some embodiments, less than about 10^{-11} M, 10^{-12} M or 10^{-13} M.

[0066] As used herein, the term “antigen-binding region” refers to a domain of the PCSK9-binding molecule of this invention that is responsible for the specific binding between the molecule and PCSK9. An antigen-binding region includes at least one antibody heavy chain variable region and at least one antibody light chain variable region. There are at least one such antigen-binding regions present in each PCSK9-binding molecule of this invention, and each of the antigen-binding regions may be identical or different from the others. In some embodiments, at least one of the antigen-binding regions of a PCSK9-binding molecule of this invention acts as an antagonist of PCSK9.

[0067] The term “antagonist,” as used herein, refers to an agent that is capable of specifically binding and inhibiting the activity of the target molecule. For example, an antagonist of PCSK9 specifically binds to PCSK9 and fully or partially inhibits PCSK9-mediated degradation of the LDLR. Inhibiting PCSK9-mediated degradation of the LDLR may or may not interfere with PCSK9 binding to the LDLR. In some cases, a PCSK9 antagonist can be identified by its ability to bind to PCSK9 and inhibit binding of PCSK9 to the LDLR. Inhibition occurs when PCSK9-mediated degradation of the LDLR, when exposed to an antagonist of the invention, is at least about 10% less, for example, at least about 25%, 50%, 75% less, or totally inhibited, in comparison to PCSK9-mediated degradation in the presence of a control or in the absence of the antagonist. A control can be exposed to no antibody or antigen binding molecule, an antibody or antigen binding molecule that specifically binds to another antigen, or an anti-PCSK9 antibody or antigen binding molecule known not to function as an antagonist. An “antibody antagonist” refers to the situation where the antagonist is an inhibiting antibody.

[0068] The term “PCSK9” or “proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a” interchangeably refer to a naturally-occurring human proprotein convertase belonging to the proteinase K subfamily of the secretory subtilase family. PCSK9 is synthesized as a soluble zymogen that undergoes autocatalytic intramolecular processing in the endoplasmic reticulum, and is thought to function as a proprotein convertase. PCSK9 plays a role in cholesterol homeostasis and may have a role in the differentiation of cortical neurons. Mutations in this the PCSK9 gene have been associated with a form of autosomal dominant familial hypercholesterolemia. *See, e.g.,* Burnett and Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26. The nucleic acid and amino acid sequences of PCSK9 are known, and have been published in GenBank Accession Nos. NM_174936.2 and NP_777596.2, respectively. As used herein, a PCSK9 polypeptide functionally binds to LDLR and promotes the degradation of LDLR. Structurally, a PCSK9 amino acid sequence has at least about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with the amino acid sequence of GenBank accession no. NP_777596.2. Structurally, a PCSK9 nucleic acid sequence has at least about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity with the nucleic acid sequence of GenBank accession no. NM_174936.2.

[0069] The phrase “PCSK9 gain-of-function mutation” refers to natural mutations occurring in PCSK9 genes that are associated with and/or causative of the familial hypercholesterolemia phenotype, accelerated atherosclerosis and premature coronary heart

disease, *e.g.*, due to enhanced LDLR degradation and a reduction of LDLR levels. The allele frequency of PCSK9 gain-of-function mutations is rare. *See*, Burnett and Hooper, *Clin Biochem Rev.* (2008) 29(1):11-26. Exemplary PCSK9 gain-of-function mutations include D129N, D374H, N425S and R496W. *See*, Fasano, *et al.*, *Atherosclerosis* (2009) 203(1):166-71. PCSK9 gain-of-function mutations are reviewed, *e.g.*, in Burnett and Hooper, *supra*; Fasano, *et al.*, *supra*; Abifadel, *et al.*, *J Med Genet* (2008) 45(12):780-6; Abifadel, *et al.*, *Hum Mutat* (2009) 30(4):520-9; and Li, *et al.*, *Recent Pat DNA Gene Seq* (2009) Nov. 1 (PMID 19601924).

[0070] “Activity” of a polypeptide of the invention refers to structural, regulatory, or biochemical functions of a polypeptide in its native cell or tissue. Examples of activity of a polypeptide include both direct activities and indirect activities. Exemplary direct activities of PCSK9 are the result of direct interaction with the polypeptide, including binding to LDLR and PCSK9-mediated degradation of LDLR. Exemplary indirect activities in the context of PCSK9 are observed as a change in phenotype or response in a cell, tissue, organ or subject to a polypeptide’s directed activity, *e.g.*, reducing increased liver LDLR, reduced plasma HDL-C, decreased plasma cholesterol, enhances sensitivity to statins.

[0071] The term “isolated,” when applied to a nucleic acid or protein, denotes that the nucleic acid or protein is essentially free of other cellular components with which it is associated in the natural state. It is preferably in a homogeneous state. It can be in either a dry or aqueous solution. Purity and homogeneity are typically determined using analytical chemistry techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis or high performance liquid chromatography. A protein that is the predominant species present in a preparation is substantially purified. In particular, an isolated gene is separated from open reading frames that flank the gene and encode a protein other than the gene of interest. The term “purified” denotes that a nucleic acid or protein gives rise to essentially one band in an electrophoretic gel. Particularly, it means that the nucleic acid or protein is at least 85% pure, more preferably at least 95% pure, and most preferably at least 99% pure.

[0072] The term “nucleic acid” or “polynucleotide” refers to deoxyribonucleic acids (DNA) or ribonucleic acids (RNA) and polymers thereof in either single- or double-stranded form. Unless specifically limited, the term encompasses nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides that have similar binding properties as the reference nucleic acid and are metabolized in a manner similar to naturally occurring nucleotides. Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (*e.g.*, degenerate codon substitutions), alleles,

orthologs, SNPs, and complementary sequences as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* **19**:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* **260**:2605-2608 (1985); and Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* **8**:91-98 (1994)).

[0073] The terms “polypeptide,” “peptide,” and “protein” are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-naturally occurring amino acid polymer.

[0074] The term “amino acid” refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, *e.g.*, hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refer to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, *i.e.*, an α -carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, *e.g.*, homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (*e.g.*, norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that functions in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

[0075] “Conservatively modified variants” applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are “silent variations,” which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes every

possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

[0076] As to amino acid sequences, one of skill will recognize that individual substitutions, deletions or additions to a nucleic acid, peptide, polypeptide, or protein sequence which alters, adds or deletes a single amino acid or a small percentage of amino acids in the encoded sequence is a "conservatively modified variant" where the alteration results in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention.

[0077] The following eight groups each contain amino acids that are conservative substitutions for one another: 1) Alanine (A), Glycine (G); 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E); 3) Asparagine (N), Glutamine (Q); 4) Arginine (R), Lysine (K); 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W); 7) Serine (S), Threonine (T); and 8) Cysteine (C), Methionine (M) (*see, e.g., Creighton, Proteins* (1984)).

[0078] "Percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a comparison window, wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (*i.e., gaps*) as compared to the reference sequence (*e.g., a polypeptide of the invention*), 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 base 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 window of comparison and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity.

[0079] The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same sequences. Two sequences are "substantially identical" if two sequences have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (*i.e., 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% sequence identity over a specified region, or,*

when not specified, over the entire sequence of a reference sequence), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window, or designated region as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by manual alignment and visual inspection. The invention provides polypeptides or polynucleotides that are substantially identical to the polypeptides or polynucleotides, respectively, exemplified herein (*e.g.*, the variable regions exemplified in any one of SEQ ID NOS:1-5, 15-19 and 40-41; the variable segments exemplified in any one of SEQ ID NOS:27-31; the CDRs exemplified in any one of SEQ ID NOS:6-14, 20-26; the FRs exemplified in any one of SEQ ID NOS: 32-39; and the nucleic acid sequences exemplified in any one of SEQ ID NOS:42-45). Optionally, the identity exists over a region that is at least about 15, 25 or 50 nucleotides in length, or more preferably over a region that is 100 to 500 or 1000 or more nucleotides in length, or over the full length of the reference sequence. With respect to amino acid sequences, identity or substantial identity can exist over a region that is at least 5, 10, 15 or 20 amino acids in length, optionally at least about 25, 30, 35, 40, 50, 75 or 100 amino acids in length, optionally at least about 150, 200 or 250 amino acids in length, or over the full length of the reference sequence. With respect to shorter amino acid sequences, *e.g.*, amino acid sequences of 20 or fewer amino acids, substantial identity exists when one or two amino acid residues are conservatively substituted, according to the conservative substitutions defined herein.

[0080] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

[0081] A “comparison window”, as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 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. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol.*

Biol. 48:443, by the search for similarity method of Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (see, e.g., Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

[0082] Two examples of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, and Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T, and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=-4 and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=-4, and a comparison of both strands.

[0083] The BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum

probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

[0084] An indication that two nucleic acid sequences or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the antibodies raised against the polypeptide encoded by the second nucleic acid, as described below. Thus, a polypeptide is typically substantially identical to a second polypeptide, for example, where the two peptides differ only by conservative substitutions. Another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules or their complements hybridize to each other under stringent conditions, as described below. Yet another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the same primers can be used to amplify the sequence.

[0085] The term “link,” when used in the context of describing how the antigen-binding regions are connected within a PCSK9-binding molecule of this invention, encompasses all possible means for physically joining the regions. The multitude of antigen-binding regions are frequently joined by chemical bonds such as a covalent bond (*e.g.*, a peptide bond or a disulfide bond) or a non-covalent bond, which can be either a direct bond (*i.e.*, without a linker between two antigen-binding regions) or indirect bond (*i.e.*, with the aid of at least one linker molecule between two or more antigen-binding regions).

[0086] The terms “subject,” “patient,” and “individual” interchangeably refer to a mammal, for example, a human or a non-human primate mammal. The mammal can also be a laboratory mammal, *e.g.*, mouse, rat, rabbit, hamster. In some embodiments, the mammal can be an agricultural mammal (*e.g.*, equine, ovine, bovine, porcine, camelid) or domestic mammal (*e.g.*, canine, feline).

[0087] The term “therapeutically acceptable amount” or “therapeutically effective dose” interchangeably refer to an amount sufficient to effect the desired result (*i.e.*, a reduction in plasma non-HDL-C, hypercholesterolemia, atherosclerosis, coronary heart disease). In some embodiments, a therapeutically acceptable amount does not induce or cause undesirable side effects. A therapeutically acceptable amount can be determined by first administering a low dose, and then incrementally increasing that dose until the desired effect is achieved. A “prophylactically effective dosage,” and a “therapeutically effective dosage,” of a PCSK9

antagonizing antibody of the invention can prevent the onset of, or result in a decrease in severity of, respectively, disease symptoms associated with the presence of PCSK9 (*e.g.*, hypercholesterolemia). Said terms can also promote or increase, respectively, frequency and duration of periods free from disease symptoms. A “prophylactically effective dosage,” and
5 a “therapeutically effective dosage,” can also prevent or ameliorate, respectively, impairment or disability due to the disorders and diseases resulting from activity of PCSK9.

[0088] The term “co-administer” refers to the simultaneous presence of two active agents in the blood of an individual. Active agents that are co-administered can be concurrently or sequentially delivered.

10 [0089] As used herein, the phrase “consisting essentially of” refers to the genera or species of active pharmaceutical agents included in a method or composition, as well as any excipients inactive for the intended purpose of the methods or compositions. In some embodiments, the phrase “consisting essentially of” expressly excludes the inclusion of one or more additional active agents other than an antagonist anti PCSK9 antibody of the
15 invention. In some embodiments, the phrase “consisting essentially of” expressly excludes the inclusion of one or more additional active agents other than an antagonist anti PCSK9 antibody of the invention and a second co-administered agent.

[0090] The term “statin” refers to a class of pharmacological agents that are competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase.

20 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0091] **Figure 1** illustrates the heavy (SEQ ID NO:1) and light (SEQ ID NO:15) chain amino acid sequences of parent mouse monoclonal antibody NVP-LFU720. The sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 are underlined and in bold.

25 [0092] **Figure 2** illustrates the heavy (SEQ ID NO:2) and light (SEQ ID NO:16) chain amino acid sequences of parent mouse monoclonal antibody NVP-LGT209. The sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 are underlined and in bold.

[0093] **Figure 3** illustrates the heavy (SEQ ID NO:2) and light (SEQ ID NO:18) chain amino acid sequences of parent mouse monoclonal antibody NVP-LGT210. The sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 are underlined and in bold.

[0094] **Figure 4** illustrates the heavy (SEQ ID NO:4) and light (SEQ ID NO:16) chain amino acid sequences of parent mouse monoclonal antibody NVP-LGT211. The sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 are underlined and in bold.

[0095] **Figures 5A-C** illustrate ELISA assay testing of binding of NVP-LGT209 (A), NVP-LGT210 (B) and NVP-LGT-211 (C) in comparison to NVP-LFU720-NX-4 to several different human and mouse antigens.

[0096] **Figures 6A-C** illustrate binding of NVP-LGT209 (A), NVP-LGT210 (B) and NVP-LGT-211 (C) in an ELISA to human and cyno Pcsk9. Secondary antibody is goat anti-mouse, diluted 1:5000. 2nd only is the secondary antibody alone control.

[0097] **Figure 7** illustrates that the parent mouse monoclonal antibody, NVP-LFU720 binds to the C-terminus of PCSK9, residues 680-692 (RSRHLAQASQELQ; SEQ ID NO:49). Humaneered™ antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 compete for the same epitope. C-term mutant A685X = SEQ ID NO:56.

[0098] **Figure 8** illustrates that parent mouse antibody NVP-LFU720 (5P20) poorly disrupts the PCSK9 and LDL-R interaction, as determined in a time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) biochemical assay. In contrast, 13C10 disrupts the PCSK9-LDL-R FRET interaction with an IC₅₀ of 50 nM. Human PCSK9 labeled with a fluorophore (hPCSK9-AF) was incubated with NVP-LFU720-AX-1 or 13C10 in assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.1% v/v Tween 20, and 0.1% w/v BSA) for 30 minutes at room temperature. This was followed by addition of europium-labeled LDL-R (hLDL-R-Eu), and further incubation at room temperature for 90 minutes, such that final concentrations were 8 nM hPcsk9-AF and 1 nM hLDL-R-Eu. TR-FRET signal (330 nm excitation and 665 nm emission) was measured with a plate reader (EnVision 2100, Perkin Elmer) and % inhibition in the presence of 5P20 or 13C10 calculated. IC₅₀ values were calculated by plotting percent inhibition values in Prism (GraphPad). Each data point represents mean ± SD (n = 4 replicates per point). Data are representative of at least two independent experiments.

[0099] **Figure 9** illustrates that the Humaneered™ antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 are equivalent to mouse antibody LFU720 at leading to increased LDL-R levels and LDL-uptake by HepG2 cells. For LDL-R measurement, cells were incubated with PCSK9-binding antibodies and labeled with anti-LDL-R antibodies. For LDL uptake, cells were incubated with PCSK9-binding antibodies, PCSK9, and DiI-LDL. LDL-R antibodies and DiI- LDL fluorescence were measured by flow cytometry. Mean + SEM for replicate

measurements are shown for each assay. Results are representative of 3 independent experiments.

[0100] For LDL-uptake assays, PCSK9-binding antibodies were incubated for 30 min at room temperature in DMEM containing 10% fetal bovine lipoprotein-deficient serum (Intracel) and 200 nM human PCSK9 (Hampton *et al.* PNAS (2007)104:14604-14609), and the antibody/PCSK9/media solutions were added to cells in 96-well plates and incubated overnight. The following day, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate-labeled LDL (DiI-LDL, Biomedical Technologies) was added for an additional 2 h. Medium was then aspirated, cells washed three times with PBS, and cells dissociated with 0.25% trypsin-EDTA. Cells were then transferred into FACS buffer (PBS containing 5% fetal bovine serum, 2mM EDTA and 0.2% sodium azide), centrifuged at 1000 x g for 10 min, aspirated, and fixed in 1% paraformaldehyde. LDL uptake was measured by cellular DiI fluorescence (excitation at 488nm and emission at 575nm) using flow cytometry (Becton Dickinson LSR II). For surface LDL-R assays, cells were incubated with serum-free media containing antibodies, washed with PBS, and harvested in Versine (Biowhittaker, 17-771E) and FACS buffer. The cells were transferred to new plates, centrifuged at 1200 rpm for 5 m, and blocked with normal rabbit IgG (MP biomedical). Cells were labeled with rabbit-anti-hLDL-R-Alexa 647 IgG (5 µg/ml) labeled antibodies in FACS buffer, centrifuged, washed, and fixed in 1% paraformaldehyde. Surface LDL-R was measured by flow cytometry (excitation of 488 nm and emission of 633 nm). EC50s were calculated using Prism (GraphPad).

[0101] **Figure 10** provides a schematic of the study design for the human PCSK9 infusion mouse model to determine the cholesterol lowering effect of the present antibodies. LGT209, LGT210, and LGT211 are Humaneered™ anti-PCSK9 antibodies that bind with high affinity to hPCSK9 with no detectable binding to murine PCSK9. To test whether LGT209, LGT210, or LGT211 could both inhibit hPCSK9-mediated elevation of non-HDL cholesterol and prevent PCSK9-mediated degradation of hepatic LDLR, the antibodies were each injected into mice 3 h before osmotic mini-pump implantation containing hPCSK9 (for continuous infusion). Plasma and liver tissue harvest were performed 24 h after hPCSK9 injection.

[0102] **Figure 11** shows that treatment with antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 resulted in accumulation of human PCSK9 (“hPCSK9”) in the infusion mouse model. Briefly, total hPCSK9 was measured by ELISA using mAb 7D16 for capture. mAb 7D16 binds a different epitope on PCSK9 than LGT209, LGT210 and LGT211 and can be used to

measure total (free and bound) PCSK9. The observed increase in total hPCSK9 is presumably due to an increase in hPCSK9/Ab complexes. Free antibody was measured by ELISA using hPCSK9 for capture. This assay measured “free” antibody and possibly measures 1:1 Ab:PCSK9 complexes. C57BL/6 mice were treated with vehicle alone, PCSK9 alone, PCSK9 + 20 mg/kg LGT210, PCSK9 + 20 mg/kg NVP-LGT211, or mouse non-specific IgG mixture (negative control). Individual data points are plotted and the mean value is demarcated by a horizontal bar; $p < 0.05$ was considered significant.

[0103] Plasma IgG levels were quantified by Meso Scale Discovery (MSD) assay. Free antibody was measured using hPCSK9 for capture. This assay measured “free” antibody and possibly measures 1:1 Ab:PCSK9 complexes. For IgG MSD assay, MSD Standard 96 plates (L11XA-3) were used. Briefly, plates were coated with 25 to 28 μ l capture antigen, PCSK9-His, 1 μ g/ml in PBS (25-28 ng/well) overnight at 4°C. The coating solution was removed and the plates were blocked with 150 μ l/well of 5% MSD Blocker A (R93AA-2) shaking for 1 h at room temperature. After washing the plate with PBS + 0.05% Tween-20 300 μ l x 3 times, 25 μ l of IgG calibrator dilutions (10 series dilutions with MSD blocker A from 10,000 to 0.0003 ng/ml), unknown plasma sample dilutions (10,000X with MSD blocker A), or quality control samples were added and incubated with shaking for 1 h at room temperature. After washing, 25 μ l/well of 1 μ g/ml detection antibody (MSD goat anti-mouse SULFO-TAG Labeled detection antibody, R32AC-5, diluted with 1% BSA / PBS / 0.05% Tween 20) was added and incubated with shaking for 1 h at room temperature. After wash and addition of 150 μ l/well 1X read buffer T, plate was read immediately on MSD SECTOR Imager 6000. A plot of the standard curve and unknown samples were calculated using MSD data analysis software.

[0104] Both plasma IgG and hPCSK9 levels were quantified by Meso Scale Discovery (MSD) assay. The MSD hPCSK9 assay is similar to IgG assay, but with the following exceptions. The plates were coated with 25-28 μ l capture antibody (7D16.C3: 2.95 mg/ml) at 1 μ g/ml. mAb 7D16 binds a different epitope on PCSK9 than LGT209, LGT210 and LGT211 and can be used to measure total (free and bound) PCSK9. After blocking the plates, 25 μ l of hPCSK9 calibrator dilutions (10 points from 10,000 to 0.0003 ng/ml) and plasma sample dilutions (10,000X with MSD blocker A) were incubated with shaking for 1 h at room temperature followed by incubation with primary detection antibody (rabbit anti-PCSK9 polyclonal antibody, Ab4, in house Rabbit ID #RB11835). An incubation step with secondary detection antibody (MSD goat anti-rabbit SULFO-TAG Labeled detection antibody, R32AB-5) was added before reading with MSD SECTOR Imager 6000. The

observed increase in total hPCSK9 is presumably due to an increase in hPCSK9/Ab complexes. Statistical analysis of was performed using GraphPad Prism 4.02 (GraphPad software, San Diego, CA). One-way ANOVA was used to analyze group differences and when overall differences were found Newman-Keuls post hoc test was used to determine specific differences amongst treated groups.

[0105] Figure 12 illustrates that antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 lead to protection of liver LDL-R from hPCSK9-mediated degradation in the infusion mouse model. C57BL/6 mice were treated with vehicle alone, PCSK9 alone, PCSK9 + 20 mg/kg LGT210, PCSK9 + 20 mg/kg NVP-LGT211, or mouse non-specific IgG mixture (negative control).

Liver samples from individual animals are shown.

[0106] Polyacrylamide gel electrophoresis of plasma membrane samples was performed using a 20-lane 4-12% Bis-Tris Invitrogen Midi gel (Invitrogen WG1402BX10) with MOPS running buffer (Invitrogen NP0001). Prepared samples were heated at 70°C for 10 minutes, placed on ice, and then a Matrix multi-channel pipettor was used to load 10 µl of each sample onto a gel. SeeBlue Plus2 markers (Invitrogen LC5925) were loaded alongside the samples for size determination and gel orientation. The gels were run at a constant voltage of 200V until the dye front reached the bottom of the gel. After electrophoresis, the gels were transferred to nitrocellulose membranes (Invitrogen IB3010-01) using an iBlot unit (Invitrogen IB1001EU). Transfer was performed at 20V for 7 min. After transfer, the membranes were blocked with Pierce Superblock T20 (Pierce 37536) for at least 30 min. Membranes were placed in “seal-a-meal” bags, and then a 1:500 dilution of rabbit anti-LDLR antibody in Superblock was added before overnight incubation at 4°C with rocking. Membranes were rinsed in TBS/0.05% Tween 5 times for 5 minutes with rocking, and then a 1:30,000 dilution of goat anti-rabbit HRP secondary antibody in Superblock was added to the membranes for 1h. Membranes were again rinsed in TBS/0.05% Tween 5 times for 5 minutes with rocking. The HRP-conjugate was detected using a Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce 37079) according to the manufacturer’s directions. Briefly, equal parts Peroxide Solution and Luminol/Enhancer Solution were mixed and added to the membranes (0.2ml/cm²) for 5 min. Excess solution was removed by blotting, and the membranes were exposed to Kodak BioMax MR X-ray film (Kodak 870 1302) for exposure.

[0107] Figures 13A-C illustrate that antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 lead to reduction in plasma non-HDL-cholesterol in the hPCSK9 infusion mouse model. Pre-injection of LGT209 antibody resulted in a 46% protection from hPCSK9-mediated elevation in non-HDL cholesterol. Pre-injection of LGT210 or LGT211 resulted in equivalent or

greater protection from hPCSK9-mediated elevation in non-HDL cholesterol. 13C10 is a validated murine anti-PCSK9 antibody that binds with high affinity to hPCSK9 and was used as a positive control for this assay. C57BL/6 mice were treated with vehicle alone, PCSK9 alone, PCSK9 + 20 mg/kg LGT209, PCSK9 + 20 mg/kg LGT210, PCSK9 + 20 mg/kg NVP-LGT211, PCSK9 + 20 mg/kg 13C10 or mouse non-specific IgG mixture (negative control). Individual values are shown with mean value demarcated as a horizontal bar. To quantify plasma total cholesterol level, Olympus clinical analyzer (Olympus America Inc.: Olympus AU400) was used. Plasma samples were diluted 1:3 in ddH₂O and 40 µl of diluted plasma samples were quantified for total cholesterol level according to the manufacturer's directions. To quantify plasma HDL and non-HDL, lipoprotein cholesterol fractions were obtained using Spife 3000 from Helena Laboratories. All procedures, including sample preparation, gel preparation, sample application, gel electrophoresis, staining, washing, and drying were following the instructions provided in the operator's manual. The gel was then scanned in the Quick Scan 2000 using Slit 5 and the relative percentage of the lipoprotein cholesterol fractions was calculated using Helena densitometer. Finally, the absolute values of HDL and non-HDL were calculated by multiplication of the percentage of each fraction and total cholesterol levels.

[0108] **Figure 14** illustrates rat pharmacokinetic (PK) profiles for antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 (human IgG1-silent) in comparison with a "typical" IgG1 (PK) profile. The half-life of antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 is markedly longer (7-13 days) in comparison to a typical IgG1 half-life (about 6 days) (*e.g.*, as determined in a human subject). There was no evidence of target mediated disposition (TMD), indicating that the antibodies are not cross-reactive with rodent PCSK9). For each test antibody, 3 male Lewis rats were injected at 10 mgs/kg. At time = 0, 1, 6, 24 h, 2, 4, 8 and 16 days, 250 µl of blood was sampled, and the cleared plasma diluted and evaluated in a capture ELISA (goat anti-human IgG) to measure total human antibody recovered. A standard curve was also generated for each test antibody. The quantity of the recovered IgG was graphed versus the expected recovery of a typical human IgG in a rat.

DETAILED DESCRIPTION

1. Introduction

[0109] The antibodies and antigen-binding molecules of the present invention specifically bind to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a (“PCSK9”). The present anti-PCSK9 antibodies and antigen-binding molecules bind to the C-terminus of PCSK9 and have the unexpected property of interfering with PCSK9-mediated degradation of the low density lipoprotein receptor (LDL-R) without interfering with binding of PCSK9 to the LDL-R. In particular, the anti-PCSK9 antibodies and antigen binding molecules bind to an epitope within residues 680-692 of PCSK9, for example, an epitope within the amino acid sequence RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO:49), located at the C-terminal end of PCSK9. Because the antibodies and antigen-binding molecules of the invention bind to PCSK9 while bound on a cell rather than only to circulating PCSK9, they have a comparatively longer *in vivo* half-life in a patient, *e.g.*, at least about 7 days or longer, and in some embodiments, provide lipid-lowering effects for at least 2 weeks after administration. The anti-PCSK9 antibodies and antigen binding molecules of the invention are antagonists of PCSK9 in that they prevent, reduce and/or inhibit PCSK9-mediated degradation of the LDL-R, thereby facilitating increased uptake of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C). The anti-PCSK9 antibodies and antigen binding molecules find use in treating subjects suffering from, *e.g.*, dyslipidemia, hypercholesterolemia, triglyceridemia and other PCSK9-mediated disease conditions.

2. Improved Anti-PCSK9 Antibodies Generally

[0110] Anti-PCSK9 antibody fragments can be produced by any means known in the art, including but not limited to, recombinant expression, chemical synthesis, and enzymatic digestion of antibody tetramers, whereas full-length monoclonal antibodies can be obtained by, *e.g.*, hybridoma or recombinant production. Recombinant expression can be from any appropriate host cells known in the art, for example, mammalian host cells, bacterial host cells, yeast host cells, insect host cells, etc. When present, the constant regions of the anti-PCSK9 antibodies can be any type or subtype, as appropriate, and can be selected to be from the species of the subject to be treated by the present methods (*e.g.*, human, non-human primate or other mammal, for example, agricultural mammal (*e.g.*, equine, ovine, bovine, porcine, camelid), domestic mammal (*e.g.*, canine, feline) or rodent (*e.g.*, rat, mouse, hamster, rabbit). In some embodiments the anti-PCSK9 antibodies are humanized or Humaneered™. In some embodiments, the constant region isotype is IgG, for example, IgG1. In some embodiments, the human IgG1 constant region is mutated to have reduced binding affinity

for an effector ligand such as Fc receptor (FcR), *e.g.*, Fc gamma R1, on a cell or the C1 component of complement. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,624,821. Antibodies containing such mutations mediate reduced or no antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC). In some embodiments, amino acid residues L234 and L235 of the IgG1 constant region are substituted to Ala234 and Ala235. The numbering of the residues in the heavy chain constant region is that of the EU index (*see*, Kabat, et al., (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Dept. Health and Human Services). *See also, e.g.*, Woodle, *et al*, *Transplantation* (1999) 68(5):608-616; Xu, *et al.*, *Cell Immunol* (2000) 200(1):16-26; and Hezareh, *et al.*, *J Virol* 75(24):12161-8.

[0111] Anti-PCSK9 antibodies or antigen-binding molecules of the invention also include single domain antigen-binding units which have a camelid scaffold. Animals in the camelid family include camels, llamas, and alpacas. Camelids produce functional antibodies devoid of light chains. The heavy chain variable (VH) domain folds autonomously and functions independently as an antigen-binding unit. Its binding surface involves only three CDRs as compared to the six CDRs in classical antigen-binding molecules (Fabs) or single chain variable fragments (scFvs). Camelid antibodies are capable of attaining binding affinities comparable to those of conventional antibodies. Camelid scaffold-based anti-PCSK9 molecules with binding specificities of the anti-PCSK9 antibodies exemplified herein can be produced using methods well known in the art, *e.g.*, Dumoulin et al., *Nature Struct. Biol.* 11:500–515, 2002; Ghahroudi et al., *FEBS Letters* 414:521–526, 1997; and Bond et al., *J Mol Biol.* 332:643-55, 2003.

[0112] The improved anti-PCSK9 antibodies of the invention are engineered human antibodies with V-region sequences having substantial amino acid sequence identity to human germline V-region sequences while retaining the specificity and affinity of a reference antibody. *See*, U.S. Patent Publication No. 2005/0255552 and U.S. Patent Publication No. 2006/0134098, both of which are hereby incorporated herein by reference. The process of improvement identifies minimal sequence information required to determine antigen-binding specificity from the variable region of a reference antibody, and transfers that information to a library of human partial V-region gene sequences to generate an epitope-focused library of human antibody V-regions. A microbial-based secretion system can be used to express members of the library as antibody Fab fragments and the library is screened for antigen-binding Fabs, for example, using a colony-lift binding assay. *See, e.g.*, U.S. Patent Publication No. 2007/0020685. Positive clones can be further characterized to identify those with the highest affinity. The resultant engineered human Fabs retain the binding specificity

of the parent, reference anti-PCSK9 antibody, typically have equivalent or higher affinity for antigen in comparison to the parent antibody, and have V-regions with a high degree of sequence identity compared with human germ-line antibody V-regions.

[0113] The minimum binding specificity determinant (BSD) required to generate the epitope-focused library is typically represented by a sequence within the heavy chain CDR3 (“CDRH3”) and a sequence within the light chain of CDR3 (“CDRL3”). The BSD can comprise a portion or the entire length of a CDR3. The BSD can be comprised of contiguous or non-contiguous amino acid residues. In some cases, the epitope-focused library is constructed from human V-segment sequences linked to the unique CDR3-FR4 region from the reference antibody containing the BSD and human germ-line J-segment sequences (*see*, U.S. Patent Publication No. 2005/0255552). Alternatively, the human V-segment libraries can be generated by sequential cassette replacement in which only part of the reference antibody V-segment is initially replaced by a library of human sequences. The identified human “cassettes” supporting binding in the context of residual reference antibody amino acid sequences are then recombined in a second library screen to generate completely human V-segments (*see*, U.S. Patent Publication No. 2006/0134098).

[0114] In each case, paired heavy and light chain CDR3 segments, CDR3-FR4 segments, or J-segments, containing specificity determinants from the reference antibody, are used to constrain the binding specificity so that antigen-binders obtained from the library retain the epitope-specificity of the reference antibody. Additional maturational changes can be introduced in the CDR3 regions of each chain during the library construction in order to identify antibodies with optimal binding kinetics. The resulting engineered human antibodies have V-segment sequences derived from the human germ-line libraries, retain the short BSD sequence from within the CDR3 regions and have human germ-line framework 4 (FR4) regions.

[0115] Accordingly, in some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies contain a minimum binding sequence determinant (BSD) within the CDR3 of the heavy and light chains derived from the originating or reference monoclonal antibody. The remaining sequences of the heavy chain and light chain variable regions (CDR and FR), *e.g.*, V-segment and J-segment, are from corresponding human germline and affinity matured amino acid sequences. The V-segments can be selected from a human V-segment library. Further sequence refinement can be accomplished by affinity maturation.

[0116] In another embodiment, the heavy and light chains of the anti-PCSK9 antibodies contain a human V-segment from the corresponding human germline sequence (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3), *e.g.*, selected from a human V-segment library, and a CDR3-FR4 sequence segment from the originating monoclonal antibody. The CDR3-FR4 sequence segment can be further refined by replacing sequence segments with corresponding human germline sequences and/or by affinity maturation. For example, the FR4 and/or the CDR3 sequence surrounding the BSD can be replaced with the corresponding human germline sequence, while the BSD from the CDR3 of the originating monoclonal antibody is retained.

[0117] In some embodiments, the corresponding human germline sequence for the heavy chain V-segment is Vh1-02. In some embodiments, the corresponding human germline sequence for the heavy chain J-segment is JH4. In some embodiments, the heavy chain J-segment comprises the human germline JH4 partial sequence WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:50). The full-length J-segment from human germline JH4 is YFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:51). The variable region genes are referenced in accordance with the standard nomenclature for immunoglobulin variable region genes. Current immunoglobulin gene information is available through the worldwide web, for example, on the ImMunoGeneTics (IMGT), V-base and PubMed databases. *See also*, Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(2):100-16; Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(3):161-74; *Exp Clin Immunogenet.* 2001;18(4):242-54; and Giudicelli, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D256-61.

[0118] In some embodiments, the corresponding human germline sequence for the light chain V-segment is VK3 L6. In some embodiments, the corresponding human germline sequence for the light chain J-segment is Jk2. In some embodiments, the light chain J-segment comprises the human germline Jk2 partial sequence FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:52). The full-length J-segment from human germline Jk2 is YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:53).

[0119] In some embodiments, the heavy chain V-segment has at least 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity to the amino acid sequence QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS(D/T)MYMSWVRQAPGQGLEWMGRID PAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFQ(A/G)RVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCA R (SEQ ID NO:28). In some embodiments, the heavy chain V-segment has at least 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity to the amino acid sequence

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPA
NEHTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO:27).

[0120] In some embodiments, the light chain V-segment has at least 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity to the amino acid sequence

- 5 (E/Q)IV(L/M)TQSPATLSVSPGERATLSC(R/S)AS(Q/S)SVSYMHYQQKPGQAPRLLI
Y(G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T)GIPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYC (SEQ ID
NO:31). In some embodiments, the heavy chain V-segment has at least 85%, 89%, 90%,
93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% sequence identity to the amino acid sequence
10 QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:29). In some embodiments, the
heavy chain V-segment has at least 85%, 89%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or
100% sequence identity to the amino acid sequence
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:30).

- 15 **[0121]** In some embodiments:

i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence
SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14); and
ii) the light chain CDR3 variable region comprises the amino acid sequence
LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

- 20 **[0122]** In some embodiments:

i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence selected from
the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13; and
ii) the light chain CDR3 comprises the amino acid sequence of SEQ ID
NO:26.

- 25 **[0123]** In some embodiments, the antibodies of the invention comprise a heavy chain
variable region comprising a CDR1 comprising an amino acid sequence (D/T)MYMS (SEQ
ID NO:8); a CDR2 comprising an amino acid sequence
RIDPAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFQ(A/G) (SEQ ID NO:11); and a CDR3 comprising an
amino acid sequence of SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14).

- 30 **[0124]** In some embodiments, the antibodies of the invention comprise a light chain
variable region comprising a CDR1 comprising an amino acid sequence
(R/S)AS(Q/S)SVSYMH (SEQ ID NO:22); a CDR2 comprising an amino acid sequence

(G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T) (SEQ ID NO:25); and a CDR3 comprising an amino acid sequence of LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).

[0125] In some embodiments, the heavy chain variable region comprises a FR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:32; a FR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:33; a FR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:34; and a FR4 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:35. The identified amino acid sequences may have one or more substituted amino acids (*e.g.*, from affinity maturation) or one or two conservatively substituted amino acids.

[0126] In some embodiments, the light chain variable region comprises a FR1 comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:36; a FR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:37; a FR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:38; and a FR4 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:39. The identified amino acid sequences may have one or more substituted amino acids (*e.g.*, from affinity maturation) or one or two conservatively substituted amino acids.

[0127] Over their full length, the variable regions of the anti-PCSK9 antibodies of the present invention generally will have an overall variable region (*e.g.*, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) amino acid sequence identity of at least about 85%, for example, at least about 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% to the corresponding human germline variable region amino acid sequence. For example, the heavy chain of the anti-PCSK9 antibodies can have at least about 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to the human germline variable region Vh1-02. The light chain of the anti-PCSK9 antibodies can have at least about 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to the human germline variable region VK3 L6. In some embodiments, only amino acids within the framework regions are added, deleted or substituted. In some embodiments, the sequence identity comparison excludes the CD3.

[0128] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:40 and comprise a light chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:41 (*i.e.*, consensus sequences).

[0129] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:1 and comprise a light chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:15 (*i.e.*, mouse LFU720).

[0130] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:2 and comprise a light chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:16 (*i.e.*, LGT-209).

[0131] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:2 and comprise a light chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:18 (*i.e.*, LGT-210).

[0132] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:4 and comprise a light chain variable region having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:16 (*i.e.*, LGT-211).

[0133] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain polypeptide having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:3 and comprise a light chain polypeptide having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:17 (*i.e.*, LGT-209).

[0134] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain polypeptide having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID

NO:3 and comprise a light chain polypeptide having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:19 (*i.e.*, LGT-210).

[0135] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies of the invention comprise a heavy chain polypeptide having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a heavy chain variable region of SEQ ID NO:5 and comprise a light chain polypeptide having at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% amino acid sequence identity to a light chain variable region of SEQ ID NO:17 (*i.e.*, LGT-211).

[0136] For identified amino acid sequences less than 20 amino acids in length, one or two conservative amino acid residue substitutions can be tolerated while still retaining the desired specific binding and/or antagonist activity.

[0137] The anti-PCSK9 antibodies of the present invention generally will bind PCSK9 with an equilibrium dissociation constant (K_D) of less than about 10^{-8} M or 10^{-9} M, for example, less than about 10^{-10} M or 10^{-11} M, in some embodiments less than about 10^{-12} M or 10^{-13} M.

[0138] The anti-PCSK9 antibodies optionally can be multimerized and used according to the methods of this invention. The anti- PCSK9 antibodies can be a full-length tetrameric antibody (*i.e.*, having two light chains and two heavy chains), a single chain antibody (*e.g.*, a scFv), or a molecule comprising antibody fragments that form one or more antigen-binding sites and confer PCSK9-binding specificity, *e.g.*, comprising heavy and light chain variable regions (for instance, Fab' or other similar fragments).

[0139] The invention further provides polynucleotides encoding the antibodies described herein, *e.g.*, polynucleotides encoding heavy or light chain variable regions or segments comprising the complementarity determining regions as described herein. In some embodiments, the polynucleotide encoding the heavy chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43 and SEQ ID NO:54. In some embodiments, the polynucleotide encoding the light chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45 and SEQ ID NO:55.

[0140] In some embodiments, the polynucleotide encoding the heavy chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid

sequence identity with a polynucleotide of SEQ ID NO:42. In some embodiments, the polynucleotide encoding the light chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide of SEQ ID NO:45 (*i.e.*, LGT-209).

- 5 [0141] In some embodiments, the polynucleotide encoding the heavy chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:42. In some embodiments, the polynucleotide encoding the light chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid
10 sequence identity with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:44 (*i.e.*, LGT-210).

- [0142] In some embodiments, the polynucleotide encoding the heavy chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID
15 NO:43. In some embodiments, the polynucleotide encoding the light chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:45 (*i.e.*, LGT-211).

- [0143] In some embodiments, the polynucleotide encoding the heavy chain has at least
20 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide of SEQ ID NO:54. In some embodiments, the polynucleotide encoding the light chain has at least 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% nucleic acid sequence identity with a polynucleotide of SEQ ID NO:55 (*i.e.*, mouse LFU720).

25 3. Assays for Identifying Anti-PCSK9 Antibodies

- [0144] Antagonist antibodies can be identified by generating anti-PCSK9 antibodies and then testing each antibody for the ability to reduce or inhibit PCSK9 mediated events, *e.g.*, binding to the LDLR, promoting the degradation of the LDLR. The assays can be carried out *in vitro* or *in vivo*. Preferred antibodies bind to PCSK9, do not prevent PCSK9 from binding
30 to LDLR, and reduce or inhibit PCSK9-mediated degradation of LDLR.

[0145] The binding of the antibodies or antigen binding molecules to PCSK9 can be determined using any method known in the art, including without limitation, ELISA, Biacore and Western Blot.

[0146] PCSK9-mediated degradation of LDLR also can be measured using any method known in the art. In one embodiment, the ability of the anti-PCSK9 antibody or antigen binding molecule to inhibit LDLR degradation is determined using an infusion mouse model. Anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules are infused intravenously (*e.g.*, 3
5 $\mu\text{g}/\text{hour}$) into a mouse and the levels of LDLR in liver membrane preparations is determined in comparison to the levels of LDLR in liver membrane preparations from a mouse that has received intravenous infusions of a control antibody (*e.g.*, that binds to an unrelated antigen). Mice that have received antagonist anti-PCSK9 antibodies will have detectably higher levels of LDLR, *e.g.*, at least 10%, 20%, 50%, 80%, 100% higher, in comparison to mice that have
10 received the control antibody.

[0147] Anti-PCSK9 antagonist antibodies also can be tested for their therapeutic efficacy in reducing plasma levels of LCL-C, non-HDL-C and/or total cholesterol. Anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules are infused intravenously (*e.g.*, 3 $\mu\text{g}/\text{hour}$) into a mammal (*e.g.*, mouse, rat, non-human primate, human) and the plasma levels of LCL-C, non-
15 HDL-C and/or total cholesterol is determined in comparison to the plasma levels of LCL-C, non-HDL-C and/or total cholesterol from the same mammal before treatment or from a mammal that has received intravenous infusions of a control antibody (*e.g.*, that binds to an unrelated antigen). The mammal that has received antagonist anti-PCSK9 antibodies will have detectably lower plasma levels of LCL-C, non-HDL-C and/or total cholesterol, *e.g.*, at
20 least 10%, 20%, 50%, 80%, 100% lower, in comparison to the mammal before treatment or the mammal that has received the control antibody.

4. Compositions Comprising Anti-PCSK9 Antibodies

[0148] The invention provides pharmaceutical compositions comprising the present anti-PCSK9 antibodies or antigen-binding molecules formulated together with a pharmaceutically
25 acceptable carrier. The compositions can additionally contain other therapeutic agents that are suitable for treating or preventing a given disorder. Pharmaceutically carriers enhance or stabilize the composition, or to facilitate preparation of the composition. Pharmaceutically acceptable carriers include solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically
30 compatible.

[0149] A pharmaceutical composition of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art. The route and/or mode of administration vary depending upon the desired results. It is preferred that administration be intravenous,

intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous, or administered proximal to the site of the target. The pharmaceutically acceptable carrier should be suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, intranasal, inhalational, spinal or epidermal administration (e.g., by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, i.e., antibody, bispecific and multispecific molecule, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

[0150] The antibodies, alone or in combination with other suitable components, can be made into aerosol formulations (i.e., they can be “nebulized”) to be administered via inhalation. Aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like.

[0151] In some embodiments, the composition is sterile and fluid. Proper fluidity can be maintained, for example, by use of coating such as lecithin, by maintenance of required particle size in the case of dispersion and by use of surfactants. In many cases, it is preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol or sorbitol, and sodium chloride in the composition. Long-term absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate or gelatin.

[0152] Pharmaceutical compositions of the invention can be prepared in accordance with methods well known and routinely practiced in the art. Pharmaceutically acceptable carriers are determined in part by the particular composition being administered, as well as by the particular method used to administer the composition. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations of pharmaceutical compositions of the present invention. Applicable methods for formulating the antibodies and determining appropriate dosing and scheduling can be found, for example, in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippincott Williams & Wilkins (2005); and in *Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press., and in *Martindale, Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 31st Edition., 1996, American Pharmaceutical Assn, and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, each of which are hereby incorporated herein by reference. Pharmaceutical compositions are preferably manufactured under GMP conditions. Typically, a therapeutically effective dose or efficacious dose of the anti-PCSK9 antibody is employed in the pharmaceutical compositions of the invention. The anti-PCSK9 antibodies are formulated into pharmaceutically acceptable dosage forms by conventional

methods known to those of skill in the art. Dosage regimens are adjusted to provide the desired response (e.g., a therapeutic response). In determining a therapeutically or prophylactically effective dose, a low dose can be administered and then incrementally increased until a desired response is achieved with minimal or no undesired side effects. For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

[0153] Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present invention can be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level depends upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors.

[0154] In some embodiments, the pharmacological compositions comprise a mixture of the anti-PCSK9 antibody or antigen binding molecule and a second pharmacological agent. For example, the compositions may comprise a anti-PCSK9 antibody or antigen-binding molecule of the invention and an agent known to be beneficial for reducing cholesterol, including LDL-C, non-HDL-C and total cholesterol and/or raising HDL-C.

[0155] Exemplary second agents for inclusion in mixtures with the present anti-PCSK9 antagonist antibody or antigen binding molecule include without limitation an HMG-CoA reductase inhibitor (*i.e.*, a statin), fibrates (*e.g.*, clofibrate, gemfibrozil, fenofibrate, ciprofibrate, bezafibrate), niacin and analogs thereof, cholesterol absorption inhibitors, bile acid sequestrants (*e.g.*, cholestyramine, colestipol, colesvelam), an ileal bile acid transport (IBAT) inhibitor, a thyroid hormone mimetic (*e.g.*, compound KB2115), a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor, a dual peroxisome proliferator-activated

receptor (PPAR) alpha and gamma agonist, an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an acyl CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor, a Niemann Pick C1-like 1 (NPC1-L1) inhibitor (*e.g.*, ezetimibe), an agonist of ATP Binding Cassette (ABC) proteins G5 or G8, a cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitor, an inhibitory
5 nucleic acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100. Lipid-lowering agents are known in the art, and described, *e.g.*, in *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Ed., Brunton, Lazo and Parker, Eds., McGraw-Hill (2006); *2009 Physicians' Desk Reference (PDR)*, for example, in the 63rd (2008) Eds., Thomson PDR.

- 10 [0156] Additional lipid lowering agents of use in the present compositions are described and/or reviewed in, *e.g.*, Chang, *et al.*, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop, *et al.*, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays and Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda and Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum, *et al.*, *Adv Cardiol* (2008)
15 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee, *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh, *et al.*, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch, *et al.*, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; and Baxter and Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320.

- [0157] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of
20 the invention are provided as a mixture with a statin. Exemplary statins include without limitation, atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.

- [0158] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of the invention are provided as a mixture with a pharmacological agent that induces
25 hypercholesterolemia or triglyceridemia. For example, the second pharmacological agent may be a protease inhibitor, for example, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudine-zidovudine (Trizivir). In some embodiments, the second pharmacological agent is Tacrolimus.

5. Methods of Using Anti-PCSK9 Antibodies

a. Conditions Subject to Treatment with Anti-PCSK9 Antibodies

[0159] The anti-PCSK9 antagonist antibodies and antigen binding molecules of the invention find use in treating any disease condition mediated by the activity or over-activity of PCSK9.

[0160] For example, individuals who have or who are at risk of developing dyslipidemia or hypercholesterolemia for any number of reasons or etiologies may benefit from administration of the present anti-PCSK9 antagonist antibodies and antigen binding molecules. For example, the individual may have familial or genetically transmitted homozygous or heterozygous hypercholesterolemia in which a functional LDL-R is present. Genetic mutations associated with and/or causative of familial or genetically inherited hypercholesterolemia are summarized, *e.g.*, in Burnett and Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1):11-26. The individual may also have other disease conditions or engage in behaviors that contribute to or increase the risk of developing dyslipidemia or hypercholesterolemia. For example, the individual may be obese, or suffer from diabetes or metabolic syndrome. The individual may be a smoker, lead a sedentary lifestyle, or have a diet high in cholesterol.

[0161] Targeting PCSK9 is useful for the reduction, reversal, inhibition or prevention of dyslipidemia, hypercholesterolemia and postprandial triglyceridemia. *See, e.g.*, Le May, *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29(5):684-90; Seidah, *Expert Opin Ther Targets* (2009) 13(1):19-28; and Poirier, *et al.*, *J Biol Chem* (2009) PMID 19635789. Accordingly, administration of the present anti-PCSK9 antagonist antibodies and antigen binding molecules finds use in reducing, reversing, inhibiting and preventing, dyslipidemia, hypercholesterolemia and postprandial triglyceridemia in an individual in need thereof.

[0162] The present anti-PCSK9 antagonist antibodies and antigen binding molecules find use in reducing or lowering low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in an individual in need thereof. The individual may have persistently elevated levels of LDL-C. In some embodiments, the individual has LDL-C plasma levels consistently above 80 mg/dL, for example above 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 mg/dL, or higher. The present anti-PCSK9 antagonist antibodies and antigen binding molecules also find use in reducing or lowering non-high density lipoprotein cholesterol (non-HDL-C) or total cholesterol in an individual in need thereof.

[0163] The individual may already be taking another pharmacological agent to lower cholesterol, and be resistant or intolerant to this agent. For example, the individual may

already be under a therapeutic regimen of a statin, which may have proven ineffectual in this individual in lowering LDL-C, non-HDL-C or total cholesterol to acceptable levels. The individual may also be intolerant to the administration of a statin. Combined administration of the present anti-PCSK9 antagonist antibodies and antigen binding molecules with a second agent useful in lowering LDL-C or non-HDL-C and/or raising HDL-C will improve the effectiveness and tolerance of the second agent, for example, by allowing lower doses of the second agent to be administered.

[0164] In some embodiments, the individual has a gain-of-function mutation in the PCSK9 gene, for example, that results in an aberrant increase in the degradation of the LDLR.

[0165] In some embodiments, the individual is receiving a pharmacological agent that induces dyslipidemia or hypercholesterolemia, *i.e.*, the individual has drug-induced dyslipidemia or hypercholesterolemia. For example, the individual may be receiving a therapeutic regime of protease inhibitors, *e.g.*, for the treatment of an HIV infection. Another pharmacological agent known to cause elevated levels of plasma triglycerides is Tacrolimus, an immunosuppressive drug administered to transplantation patients. Cyclosporin has been shown to increase LDL significantly. *See, e.g.*, Ballantyne, *et al.* (1996) 78(5):532-5. Second-generation antipsychotics (*e.g.*, aripiprazole, clozapine, olanzapine, quetiapine, risperidone, and ziprasidone) have also been associated with dyslipidemia. *See, e.g.*, Henderson, *J Clin Psychiatry* (2008) 69(2):e04 and Brooks, *et al.*, *Curr Psychiatry Rep* (2009) 11(1):33-40.

b. Administration of Anti-PCSK9 Antibodies

[0166] A physician or veterinarian can start doses of the antibodies of the invention employed in the pharmaceutical composition at levels lower than that required to achieve the desired therapeutic effect and gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. In general, effective doses of the compositions of the present invention vary depending upon many different factors, including the specific disease or condition to be treated, means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. Treatment dosages need to be titrated to optimize safety and efficacy. For administration with an antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 1 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg. Dosing can be daily, weekly, bi-weekly, monthly, or more or less often, as needed or desired. An

exemplary treatment regime entails administration once weekly, once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months.

[0167] In some embodiments, an polynucleotide encoding an anti-PCSK9 antibody or antigen binding molecule of the invention is administered. In embodiments where the agent is a nucleic acid, typical dosages can range from about 0.1 mg/kg body weight up to and including about 100 mg/kg body weight, *e.g.*, between about 1 mg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. In some embodiments, about 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 or 50 mg/kg body weight.

[0168] The antibody can be administered in single or divided doses. Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be weekly, bi-weekly, monthly or yearly, as needed or desired. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of anti-PCSK9 antibody in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of 1–1000 µg/ml and in some methods 25-300 µg/ml. Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, humanized antibodies show longer half life than that of chimeric antibodies and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime. In some embodiments, the anti-PCSK9 antibody or antigen binding agent is administered when plasma LDL-C levels in the patient rise above a predetermined threshold level, for example, at least about 80 mg/dL, for example, at least about 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 mg/dL, or higher.

c. Co-Administration with a Second Agent

[0169] The PCSK9 antibody antagonist can be used in combination with agents known to be beneficial for reducing cholesterol, including LDL-C, non-HDL-C and total cholesterol and/or raising HDL-C.

5 [0170] Active agents can be administered together in a mixture with the anti-PCSK9 antagonist antibody or each agent can be administered separately. The antibody agent and the other active agent can, but need not, be administered concurrently.

[0171] Exemplary second agents for use in co-administration with the present anti-PCSK9 antagonist antibody or antigen binding molecule include without limitation an HMG-CoA reductase inhibitor (*i.e.*, a statin), fibrates (*e.g.*, clofibrate, gemfibrozil, fenofibrate, ciprofibrate, bezafibrate), niacin and analogs thereof, cholesterol absorption inhibitors, bile acid sequestrants (*e.g.*, cholestyramine, colestipol, colesvelam), an ileal bile acid transport (IBAT) inhibitor, a thyroid hormone mimetic (*e.g.*, compound KB2115), a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor, a dual peroxisome proliferator-activated
10 receptor (PPAR) alpha and gamma agonist, an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an acyl CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor, a Niemann Pick C1-like 1 (NPC1-L1) inhibitor (*e.g.*, ezetimibe), an agonist of ATP Binding Cassette (ABC) proteins G5 or G8, a cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitor, an inhibitory nucleic acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100.

20 [0172] Additional lipid lowering agents of use are described and/or reviewed in, *e.g.*, Chang, *et al.*, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop, *et al.*, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays and Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda and Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum, *et al.*, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee, *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh, *et al.*, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch, *et al.*, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; and Baxter and Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320.

[0173] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of
30 the invention are co-administered with a statin. Exemplary statins include without limitation, atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.

[0174] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of the invention are co-administered with a pharmacological agent that induces hypercholesterolemia or triglyceridemia. For example, the second pharmacological agent may be a protease inhibitor, for example, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudine-zidovudine (Trizivir). In some embodiments, the second pharmacological agent is Tacrolimus.

[0175] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of the invention are co-administered with an inhibitory nucleic acid (*e.g.*, an siRNA, an miRNA, an antisense sequence, a ribozyme) that specifically targets PCSK9 or apoB100.

6. Kits

[0176] The pharmaceutical compositions of the present invention can be provided in a kit. In certain embodiments, a kit of the present invention comprises an anti-PCSK9 antagonist antibody or antigen binding molecule of the invention, as described herein. The anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules can be provided in uniform or varying dosages.

[0177] In some embodiments, the kits comprise one or more second pharmacological agents, as described herein. The second pharmacological agent can be provided in the same formulation or in separate formulations from the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules. The dosages of the first and second agents can be independently uniform or varying.

[0178] In some embodiments, the kits comprise the PCSK9 antibody antagonist and one or more agents known to be beneficial for reducing cholesterol, including LDL-C, non-HDL-C and total cholesterol and/or raising HDL-C.

[0179] Exemplary second agents for inclusion in the kits with the present anti-PCSK9 antagonist antibody or antigen binding molecule include without limitation an HMG-CoA reductase inhibitor (*i.e.*, a statin), fibrates (*e.g.*, clofibrate, gemfibrozil, fenofibrate, ciprofibrate, bezafibrate), niacin and analogs thereof, cholesterol absorption inhibitors, bile acid sequestrants (*e.g.*, cholestyramine, colestipol, colesvelam), an ileal bile acid transport (IBAT) inhibitor, a thyroid hormone mimetic (*e.g.*, compound KB2115), a microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitor, a dual peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma agonist, an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an acyl CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor, a Niemann Pick C1-like 1 (NPC1-L1) inhibitor (*e.g.*, ezetimibe), an agonist of ATP Binding Cassette

(ABC) proteins G5 or G8, a cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitor, an inhibitory nucleic acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100.

[0180] Additional lipid lowering agents of use in the kits are described and/or reviewed in, e.g., Chang, *et al.*, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4):562-70; Sudhop, *et al.*, *Drugs* (2002) 62(16):2333-47; Bays and Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar(134):45-50; Tomoda and Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3):375-89; Tenenbaum, *et al.*, *Adv Cardiol* (2008) 45:127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2):S241-S248; Lee, *et al.*, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11):1785-8; Oh, *et al.*, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch, *et al.*, *J Med Chem* (2009) 52(6):1558-68; and Baxter and Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8:308-320.

[0181] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of the invention provided in kits with a statin. Exemplary statins include without limitation, atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.

[0182] In some embodiments, the anti-PCSK9 antibodies or antigen binding molecules of the invention are provided in kits with a pharmacological agent that induces hypercholesterolemia or triglyceridemia. For example, the second pharmacological agent may be a protease inhibitor, for example, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudine-zidovudine (Trizivir). In some embodiments, the second pharmacological agent is Tacrolimus.

EXAMPLES

The following examples are offered to illustrate, but not to limit the claimed invention.

Example 1: Generation and Identification of the Pcsk9 antagonist NVPLFU720

Summary

[0183] Studies were performed to generate a functional antibody antagonist against Pcsk9. Multiple hybridomas were identified that secreted an antibody capable of binding to a His-tagged version of the protein. Antibodies from hybridomas were evaluated for functional antagonist activity as measured by their ability to inhibit Pcsk9-mediated degradation of the

LDL receptor on HepG2 cells resulting in an increased ability of these cells to take up LDL cholesterol. A potent functional murine anti-human Pcsk9 IgG1-kappa monoclonal antibody was identified and designated as NVP-LFU720 (LFU720).

Methods

5 Antigen and other proteins

[0184] A stable expression cell line secreting human Pcsk9 protein was generated by transfection of HEK293 Freestyle™ cells (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Briefly, the cells cultivated in Freestyle™ medium (Invitrogen) plus 10 % fetal calf serum in adherent mode on BioCoat flasks (Becton Dickinson) were transfected using Lipofectamine 2000™
10 transfection reagent and a recombinant plasmid featuring the mellittin signal sequence, the mature Pcsk9 cDNA (aa 31-692) and a his₆ (SEQ ID NO:57) tag at the C-terminus of the sequence (cloned by E.Hampton, GNF, NPL 010051). 48 hours post transfection selection of positive transfectants was started by adding 100 µg/mL Zeocin into the cultivation medium. Four weeks later four stable cell pools of Pcsk9-producing cells had emerged. Pool 4, being
15 the highest producer, was adapted to serum-free suspension conditions in Freestyle™ medium and was subsequently scaled up for large scale production using the Wave™ bioreactor at a scale of 10-20 L production volume.

[0185] Several runs were performed over time yielding recombinant protein produced at rates between 12 and 30 mg/L. The cell supernatants were harvested and concentrated by
20 crossflow filtration. The resulting concentrate was applied to a 25 mL NiNTA His-Bind Superflow column (equilibrated with 50 mM Tris/300 mM NaCl/1 mM CaCl₂/2 mM β-Mercaptoethanol, pH 7.4) at 0.5 mL/min. After baseline washing with 50 mM Tris/300 mM NaCl/20 mM Imidazole, pH 7.4, bound material was eluted with 50 mM Tris/300 mM NaCl/250 mM Imidazole, pH 7.4. The resulting eluate was dialyzed against PBS, pH 7.3,
25 sterile filtered and aliquotted. A sample was analyzed by analytical size-exclusion chromatography for determination of oligomerization. The HPLC chromatogram obtained of the purified protein shows two peaks, the major one accounting for 85%. HPLC-ESI MS analysis of full length protein reveals a mass of 58176.0 Da which is according the expected mass from mellitin-hsPcsk9 aa31-692-His with all Cysteine residues oxidized. Part of sample
30 is additionally N-glycosylated. The contaminating protein of approx 13 kD mass resembles, most likely, the free pro-domain of the protein. The corresponding homologues of Pcsk9 from mouse and cynomolgus monkey were produced in large-scale transient expression approaches using again HEK293 Freestyle cells cultivated in serum-free suspension in Freestyle medium. The recombinant plasmids, mouse Pcsk9 cDNA featuring a natural leader
35 sequence and a his₆ (SEQ ID NO:57) tag at the C-terminus and cyno Pcsk9 featuring a CD33

leader sequence and a C-terminal his₆ (SEQ ID NO:57) tag were transfected into Freestyle cells using Polyethylenimine as carrier of plasmid DNA at a ratio of 1:3 (µg/mL:µg/mL DNA:PEI). Production runs were carried out at the 10 liter scale in Wave™ bioreactors; protein purification and characterization was done analogously to the protocols described above for the human Pcsk9 protein. Yields for mouse Pcsk9 protein ranged between 0.7 and 2.7 mg/L culture, cyno Pcsk9 was obtained at 3.1 mg/L.

Hybridoma generation

Immunization of Mice and Production of Hybridomas

[0186] Purified Pcsk9 was diluted 1:1 with Freund's Complete Adjuvant prior to immunization of Bcl-2 transgenic mice (C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 wehi strain). Mice were immunized using a procedure that calls for Repetitive Immunization at Multiple Sites (RIMMS). Briefly, mice were injected with 1-3 µg of antigen at 8 specific sites proximal to peripheral lymph nodes (PLN). This procedure was repeated 6 times over a 12-day period. On Day 12, a test bleed was collected and the serum antibody titer was analyzed by ELISA. Pooled PLN were removed from high titer mice on Day 15. To harvest lymphocytes, PLN were washed twice with plain DMEM and then dissociated by passage through a .22 micron screen (Falcon #352350). The resulting lymphocytes were washed 2 additional times prior to fusion. NSO/Bcl-2 myeloma cells were mixed with lymphocytes at a ration of 2.5 lymphocytes to 1 NSO cell. The cell mixture was centrifuged and 1 mL of PEG 1500 was subsequently added drop wise to the cell pellet for 1 min. After 30 seconds, 1 mL of DMEM was slowly added, and 1 min later, 19 mL of DMEM was added for 5 min. Fused cells were pelleted, resuspended at a density of 2 x 10⁵ cells/mL in HAT media (DMEM + 20 % FBS, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HAT, 0.5x HFCS), and placed at 37 °C for one h. The cells were then plated in 384-well plates at 60 µL / well.

Screening of Hybridomas Secreting Functional Antibodies to Pcsk9

[0187] Ten days after fusion, hybridoma plates were screened for the presence of Pcsk9 specific antibodies. For the ELISA screen, Maxisorp 384-well plates (Nunc #464718) were coated with 50 µL of Pcsk9 (diluted to 15 ng/well in PBS) and incubated overnight at 4 °C. The remaining protein was aspirated and wells were blocked with 1 % BSA in PBS. After 30 min incubation at room temperature, the wells were washed four times with PBS + 0.05 % Tween (PBST). 15 µL of hybridoma supernatant was transferred to the ELISA plates. 15 µL of mouse serum, taken at the time of PLN removal, was diluted 1:1000 in PBS and added as a positive control. 50 µL of secondary antibody (goat anti mouse IgG – HRP (Jackson Immuno Research #115-035-071), diluted 1:5000 in PBS) was added to all wells on the ELISA plates. After incubation at room temperature for 1 h, the plates were washed eight times with PBST.

25 μ L of TMB (KPL #50-76-05) was added and after 30 min incubation at room temperature; the plates were read at an absorbance of 605 nm. Cells from positive wells were expanded into 24- well plates in HT media (DMEM + 20 % FBS, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HT, 0.5x HFCS).

5

Antibody purification

[0188] Supernatant containing LFU720 was purified using protein G (Upstate # 16-266 (Billerica, MA)). Prior to loading the supernatant, the resin was equilibrated with 10 column volumes of PBS. Following binding of the sample, the column was washed with 10 column
10 volumes of PBS, and the antibody was then eluted with 5 column volumes of 0.1 M Glycine, pH 2.0. Column fractions were immediately neutralized with 1/10th volume of Tris HCl, pH 9.0. The OD280 of the fractions was measured, and positive fractions were pooled and dialyzed overnight against PBS, pH 7.2.

Binding kinetics and Biacore assay

15 [0189] Determination of kinetic binding parameters was done by surface plasmon resonance measurements using the optical biosensor Biacore S51. This technology allows the label-free determination of the microscopic rate constants for binding (k_a) and dissociation (k_d) of a ligand to a receptor. It is, therefore, especially suited for characterizing the antibody-antigen interactions.

20 [0190] Binding studies of Pcsk9 to the LFU720 (2 μ g/mL) were carried out by capturing the mouse antibody with a rabbit anti-mouse Fc γ antibody (Biacore #BR-1005-14) that was previously immobilized onto a Series S CM-5 Biacore sensor chip (certified) (Biacore #BR-1005-30). Covalent binding of the Fc γ capture antibody was done with the 'Amine Coupling Kit' (Biacore #BR-1000-50). The capture antibody (rabbit-anti-mouse) was attached to the
25 EDCactivated dextran surface with a 50 μ g/mL anti-Fc γ antibody solution in 10 mM sodium acetate, pH 5 (Biacore #BR-1003-51) at a flow rate of 10 μ L/min. A range of concentrations of Pcsk9 from 0.5 μ M to 7.8 nM (2 fold serial dilution) were flowed over the captured LFU720 chip in PBS plus 100 mM NaCl, 0.005 % P20 (Biacore #BR-1000-54). The resulting sensorgrams were analyzed using the Biacore S51 Evaluation Software. Data from all
30 concentrations was fitted globally to a 1:1 Langmuir model.

TR-FRET Assay

[0191] The TR-FRET assay was performed in 384-well white, shallow plates (Perkin Elmer, 6008280). hPcsk9-AF (10.7 nM) was incubated with serial dilutions of unlabeled hPcsk9 protein, EGF-A peptide, or NVP-LFU720-AX-1 antibody for 30 minutes at room
35 temperature in 15 μ L of assay buffer (20 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂,

0.1% v/v Tween 20, and 0.1% w/v BSA). This was followed by addition of 5 μ L of hLDL-R-Eu (4 nM) in assay buffer to the hPcsk9 and NVP-LFU720-AX-1 preincubated complex, and incubation at room temperature for 90 minutes. The final concentrations of these labeled proteins were 8 nM of hPcsk9-AF and 1 nM of hLDL-R-Eu. The TR-FRET signal was measured with EnVision 2100 multilabel reader (Perkin Elmer) at 330 nm excitation and 665 nm emission. Data was converted to normalized values using the following formula: [(665 nm value x 10,000)/(615 nm value)]. The percentage inhibition was calculated with the following formula: $100 - [(\text{normalized value of treated sample} / \text{averaged normalized value of untreated samples}) \times 100]$. The percentage inhibition dose response curves were plotted using Prism version 5 with the formula, $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$ (GraphPad Prism Software).

LDL-R Turnover Assay

[0192] HepG2 cells were trypsinized and seeded at 6×10^4 cells per well in 100 μ L of culture medium in flat bottomed 96-well plates (Corning, 3595) which were pre-coated with 1% v/v collagen), then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 24 hours. Generally, cells were treated with 100 μ L of serum-free medium containing either hPcsk9 protein, EGF-A peptide and/or NVP-LFU720-AX-1 antibody. After treatment, the medium was discarded, and the cells were washed with 100 μ L of PBS. To harvest the cells, 100 μ L of Versine (Biowhittaker, 17-771E) was added and incubated for one hour at 37°C in 5% CO₂, followed by addition of 100 μ L of FACS buffer. The cells were transferred to V-bottom 96-well plates (Corning, 3894) and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes to pellet the cells. To block non-specific binding sites on the cells, 50 μ L of 100 μ g/mL normal rabbit IgG (MP biomedical, 55944) and mouse IgG (Sigma, I5381) in FACS buffer were added to each well and incubated for 30 minutes in ice. Cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min, and the buffer was removed by flicking the plate. To label the cells, 10 μ L of rabbit anti-hLDL-R-Alexa 647 IgG (5 μ g/mL) and 10 μ L of mouse anti-transferrin-R-phycoerythrin (PE) IgG (2 μ g/mL) (CD71, Becton Dickinson Biosciences, 624048) labeled antibodies in FACS buffer were added to each well and incubated for 60 minutes in ice. Cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min, and the buffer was removed by flicking the plate. Unbound antibodies were removed by washing the cells twice with 200 μ L per well of FACS buffer. Cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS, and viable cells were gated (5000) and analyzed using a BD LSR II flow cytometer and FACSDIVA software (Becton Dickinson). The median value of PE fluorescence was measured at excitation of 488 nm and emission of 575 nm. The median value of Alexa 647 fluorescence was measured at excitation of 488 nm and emission of 633 nm. A custom made rabbit anti-hLDL-R polyclonal IgG 583 was custom produced by

Covance (Denver, PA, USA) for the FACS detection of surface hLDL-R on HepG2 cells.

The rabbit anti-hLDL-R IgG 583 exhibited approximately a 7-fold window for detection of hLDL-R on the surface of HepG2 cells as compared to normal rabbit IgG. To determine the specificity of the anti-hLDL-R IgG 583 for LDL-R on the surface of HepG2 cells, an

5 experiment was performed using hLDL-R protein as a competitor for binding of this IgG. A dose-dependent decrease in the average medium fluorescence for the anti-hLDL-R IgG 583 towards HepG2 cells was observed with increasing concentrations of hLDL-R protein. This demonstrated the anti-hLDL-R IgG 583 specifically recognizes the LDL-R on the surface of HepG2 cells as measured by FACS. Future work used directly labeled anti-hLDL-R-583-

10 Alexa 647 IgG for the FACS quantification of LDL-R on the surface of HepG2 cells.

LDL-C Uptake

[0193] HepG2 cells were trypsinized and seeded at 6×10^4 cells per well in 100 μ L of culture medium in flat bottomed 96-well plates (Corning, 3595, which were pre-coated with 1% v/v collagen), then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 24 hours. Unless otherwise stated, 15 cells were treated with 100 μ L of serum-free medium containing either hPcsk9 protein, EGF-A peptide and/or NVP-LFU720-AX-1 antibody. After treatment, each well received 20 μ L of 30 μ g/mL 3,3'-dioctadecylindocarbocyanine-labeled low-density lipoprotein (DiI-LDL) (Intracell, RP-077-175) in serum-free medium and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 2 hours. The medium was removed by flicking the plates, and the cells were washed with 100 μ L of 20 phosphate buffered saline (PBS without calcium or magnesium, Invitrogen, 14190-144). The PBS was removed by flicking the plates, and 100 μ L of 0.25% trypsin-EDTA was added to each well and incubated for 5 minutes at 37°C in 5% CO₂. One hundred μ L of FACS buffer (PBS containing 5% FBS, 2 mM EDTA, and 0.2% sodium azide) was added to each well, and the cells were pelleted by centrifugation at 1200 rpm for 5 minutes. The medium was 25 discarded by flicking the plate, and the cells were fixed by addition of 50 μ L of 1% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, 15710) in PBS per well. Viable cells were gated and analyzed using a BD LSR II flow cytometer and FACSDIVA software (Becton Dickinson). The median value of DiI-LDL fluorescence was measured at excitation 488 nm and emission 575 nm, and 5000 cells were analyzed. Bar graphs were generated using 30 Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation). Percentage of activation was calculated as follows, % Activation = $[1 - (X \div A)] \times 100$, where X = medium fluorescence reading from sample well and A = medium fluorescence reading from well with only hPcsk9 treatment.

[0194] Percentage of activation was plotted versus treatment to determine EC₅₀'s from dose response curves generated using the equation $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}))}$ and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

Results**Generation of an anti-human Pcsk9 monoclonal antibody**

[0195] B-cells were harvested from the primary lymph nodes of animals immunized with Pcsk9 protein. Hybridoma were generated using standard PEG-mediated fusion. The resulting fusion was assayed by ELISA, and positive binders to human Pcsk9 were identified and expanded to generate supernatants. There were multiple ELISA positive clones identified that were subsequently triaged by functional assays. The clone that was identified as the lead candidate is LFU720. In addition to our lead candidate, LFU720, multiple other clones were identified that failed to block the interaction of Pcsk9 and LDLr (as measured by FRET) yet when bound to Pcsk9 were able to block Pcsk9's ability to mediate LDLr degradation (as measured by LDLc uptake), including clones 21D6, 5A4-C1, and 13F1. Clone 21D6 also showed the ability to block Pcsk9 degradation of the LDLr *in vivo*.

Screening of LFU720 for binding specifically to Pcsk9

[0196] LFU720 specificity was examined by evaluating binding in ELISA to a series of other proteins. The binding of LFU720 to three other HIS-tagged proteins was compared to binding to Pcsk9-HIS. This demonstrated that the binding to Pcsk9 is specific, and that the antibody was not binding to the HIS tag.

Evaluation of LFU720 for binding to the cynomolgus Pcsk9

[0197] The binding of LFU720 to the cynomolgus homolog of Pcsk9 was determined. For this assay, the supernatants from cells expressing the cynomolgus HIS-tagged Pcsk9 were utilized along with a Ni capture plate, avoiding the need to purify the material. Human Pcsk9 was dilute and also captured via its HIS-tag. LFU720 was able to bind to both human and cynomolgus Pcsk9. 5P20 also did not bind to human LDL-R or mouse Pcsk9 in ELISA.

Binding kinetics of LFU720

[0198] The mouse antibody LFU720, that recognizes the human Pcsk9 protein, was analyzed for its binding affinity by using an optical biosensor technique (Biacore). LFU720 was found to bind with high affinity to recombinant human Pcsk9 with sub-nanomolar affinity ($K_D = 200$ pM).

Screening of LFU720 for blocking the Pcsk9/LDL-R interaction

[0199] TR-FRET assay was used for determining if the anti-hPcsk9 antibody NVP-LFU720 could disrupt the interaction between hPcsk9-AF and hLDL-R-Eu labeled proteins. Unlabeled hPcsk9 protein or EGF-A peptide were evaluated to demonstrate the assay could detect the disruption of the TR-FRET signal generated by interaction of hLDL-R-Eu and hPcsk9-AF labeled proteins. Increasing concentrations of unlabeled hPcsk9 competed with hPcsk9-AF for binding to hLDL-R-Eu, which resulted in a decrease of the TR-FRET signal.

The EGF-A peptide disrupted the interaction between hLDL-R-Eu and hPcsk9-AF with an IC_{50} of 2.5 μ M. Conversely, NVP-LFU720 poorly disrupted the TR-FRET signal between hPcsk9-Eu and hLDL-R-AF with an IC_{50} greater than 1000 nM, and exhibited a U-shaped response at low antibody concentrations.

5 **Screening of LFU720 for inhibiting Pcsk9-mediated degradation of the LDL-R**

[0200] Pcsk9 binding to the LDL-R has been shown to lead to LDL-R degradation, and this was confirmed using HepG2 cells and recombinant human Pcsk9. The ability of LFU720 to bind Pcsk9 and block this effect was determined. NVP-LFU720 inhibited exogenous hPcsk9
10 treated HepG2 cells and led to increased cell-surface LDL-R.

Screening of LFU720 for inhibiting Pcsk9 and restoring LDLuptake

[0201] The inhibition of Pcsk9 degradation of the LDL-R should restore the ability of HepG2 cells to internalize LDL-C. . NVP-LFU720 prevented Pcsk9-mediated LDL-R degradation on HepG2 cells treated with exogenous hPcsk9 and led to increased DiI-LDL-
15 uptake with an EC_{50} of 99 nM.

Example 2: Creation of PCSK9 Antagonist Antibodies NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT211

Introduction

20 [0202] This example describes the generation of human antibodies NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP LGT211 by engineering the murine monoclonal PCSK9 antagonist antibody NVP-LFU720 to have greater sequence homology to a human germline antibody. NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP LGT211 retain the epitope specificity, affinity, and cynomolgus macaque PCSK9 cross-reactivity of the parent murine antibody, NVP-LFU720.
25 NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP LGT211 have much higher homology to the human germline sequence than the original murine antibody and should therefore be better tolerated by the human immune system.

[0203] Mouse monoclonal antibody LFU720 was Humaneered™ to bring its protein sequence closer to a human germline sequence and decrease its immunogenicity.

30 Humaneering™ technology is available through KaloBios of South San Francisco (on the worldwide web at kalobios.com). Antibody Humaneering™ generates engineered human antibodies with V-region sequences that have high homology to a human germline sequence while still retaining the specificity and affinity of the parent or reference antibody (U.S. Patent Publ. 2005/0255552 and 2006/0134098). The process first identifies the minimum

antigen binding specificity determinants (BSDs) in the heavy and light chain variable regions of a reference Fab (typically sequences within the heavy chain CDR3 and the light chain CDR3). As these heavy and light chain BSDs are maintained in all libraries constructed during the Humaneering™ process, each library is epitope-focused, and the final, fully
5 Humaneered™ antibodies retain the epitope specificity of the original mouse antibody.

[0204] Next, full-chain libraries (in which an entire light or heavy chain variable region is replaced with a library of human sequences) and/or cassette libraries (in which a portion of the heavy or light chain variable region of the mouse Fab is replaced with a library of human sequences) are generated. A bacterial secretion system is used to express members of the
10 library as antibody Fab fragments, and the library is screened for Fabs that bind antigen using a colony-lift binding assay (CLBA). Positive clones are further characterized to identify those with the highest affinity. Identified human cassettes supporting binding in the context of residual murine sequences are then combined in a final library screen to generate completely human V-regions.

[0205] The resulting Humaneered™ Fabs have V-segment sequences derived from human libraries, retain the short BSD sequences identified within the CDR3 regions, and have human germline Framework 4 regions. These Fabs are converted to full IgGs by cloning the variable regions of the heavy and light chains into IgG expression vectors. Fully
15 Humaneered™ antibodies generated in this process retain the binding specificity of the parent, murine antibody, typically have equivalent or higher affinity for antigen than the parent antibody, and have V-regions with a high degree of sequence identity compared with human germline antibody genes at the protein level.

Methods

Cloning of murine V-regions

[0206] The V-region DNA from murine monoclonal NVP-LFU720 was amplified by RT-PCR from RNA isolated from the hybridoma cell line using standard methods. Primers successfully used for PCR amplification of the heavy chain variable region from hybridoma cDNA were V_H14 (5'-CTTCCTGATGGCAGTGGTT-3'; SEQ ID NO:58) (Chardes T, *et al*
1999, *FEBS Letters*; 452(3):386-94) and HCconstant (5'-
25 GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC-3'; SEQ ID NO:59). Primers successfully used for PCR amplification of the light (kappa) chain variable region from hybridoma cDNA were V_κ4/5 (5'-TCAGCTTCYTGCTAATCAGTG-3'; SEQ ID
30 NO:60) (Chardes T, *et al.*, 1999, *supra*) and LCconstant (5'-

GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG-3'; SEQ ID NO:61). The amplified heavy and light chain variable regions were sequenced. PCR was then used to amplify the V-genes and to incorporate restriction enzyme sites for cloning into KaloBios vectors: Vh into KB1292-His (modified version of KB1292 that encodes a C-terminal flexible linker and 6-His (SEQ ID NO:57) tag of amino acid sequence AAGASHHHHHH (SEQ ID NO:62) on CH1) at *Nco*I (5') and *Nhe*I (3'); Vk into KB1296 at *Nco*I (5') and *Bsi*WI (3'). These separate heavy and light chain vectors were then combined into a single dicistronic KaloBios Fab expression vector by restriction digest with *Bss*HII and *Cla*I and ligation. Fab fragments were expressed in *E. coli* from this vector. This Fab was tested for PCSK9-antigen binding and is referred to as reference Fab SR032.

Fab purification

[0207] Fab fragments were expressed by secretion from *E. coli* using KaloBios expression vectors. Cells were grown in 2xYT medium to an OD600 of ~0.6. Expression was induced by adding IPTG to 100 μ M and shaking for 4 hours at 33°C. Assembled Fab was obtained from periplasmic fractions by osmotic lysis and purification by affinity chromatography using Ni-NTA columns (HisTrap HP columns; GE Healthcare catalog #17-5247-01) according to standard methods. Fabs were eluted in buffer containing 500 mM imidazole and thoroughly dialyzed against PBS pH 7.4 without calcium and magnesium.

Library construction

[0208] For the first step in library construction, epitope-focused full human V-region libraries were generated by PCR amplification of KaloBios human V-segment library sequences. In making these full-chain libraries, the unique CDR3-FR4 regions containing the BSD and human germline J-segment sequences from the optimized reference Fab SR038 were attached to the human V-segment libraries using overlapping PCR. These full V-region libraries were not screened directly; rather, they were used as templates for construction of the Vh and Vk middle libraries. KaloBios human V-segment libraries used for full-chain library construction were chosen based on the human germline sequence closest to the original murine Vh and Vk's in the CDR regions. The original murine NVP-LFU720 Vh is closest to human germline sequence Vh1-02 in its CDRs, so a mixture of the two KaloBios libraries that contains Vh1 subgroup members (KB1410 and KB1411) was used in making the full Vh library. Likewise, as the NVP-LFU720 Vk is closest to the Vk3 L6 human germline sequence in its CDRs, a mixture of the two KaloBios human V-segment libraries containing Vk3 subgroup members (KB1423 and KB1424) was used in making the full Vk

library. These full-length Vh and Vk libraries were then used as templates for the construction of cassette libraries in which only part of the parent murine V-segment is replaced by a library of human sequences. Two types of cassettes were constructed by bridge PCR: front-end cassettes containing human sequences in FR1, CDR1, and the first part of FR2 were amplified from the mixture of Vh1 libraries (KB1410 and KB1411) or the mixture of Vk3 libraries (KB1423 and KB1424) described above as a template. Middle cassettes containing human sequences in the last part of FR2, CDR2, and FR3 were amplified using the full human Vh- or Vk-region libraries described above as templates. Vh cassettes had overlapping common sequences in FR2 at amino acid positions 45-49 (Kabat numbering); Vk cassettes had overlapping common sequences in FR2 at amino acid residues 35-39 (Kabat numbering). In this way, front-end and middle human cassette libraries were constructed by PCR for human V-heavy 1 and V-kappa 3 isotypes. Each Vh cassette library was cloned into vector KB1292-His at *Nco*I (5') and *Kpn*I (3'); each Vk cassette library was cloned into vector KB1296-B (modified version of KaloBios vector KB1296 which has a silent *Hind*III site added in FR4) at *Nco*I (5') and *Hind*III (3'). Resultant Vh or Vk plasmid libraries were then combined with the complementary chain from the optimized reference Fab SR038 (e.g., the Vh front-end library was combined with the optimized reference Vk vector) by digestion with *Bss*HII and *Cla*I and subsequent ligation to create libraries of dicistronic vectors expressing full Fabs.

General ELISA

[0209] Recombinant human or cynomolgus macaque PCSK9-His6 antigen was used for all ELISA assays. Typically, PCSK9-His6 antigen diluted in PBS pH 7.4 was bound to a 96-well microtiter plate at 300 ng/well by overnight incubation at 4°C. The plate was blocked with a solution of 3% BSA in PBS for one hour at 37 °C, and then rinsed once with PBST. Fab-containing induced cell medium or diluted, purified Fab (50 µL) was then added to each well. After a one-hour incubation at 37°C, the plate was rinsed three times with PBST. Anti-human-kappa chain HRP conjugate (Sigma #A7164) diluted 1:5000 in PBS (50 µL) was added to each well, and the plate was incubated for 45 min at room temperature. The plate was washed three times with PBST, then 100 µL of SureBlue TMB substrate (KPL #52-00-03) was added to each well and the plate was incubated for ~10 min at room temperature. The plate was read at 650 nm in a spectrophotometer.

[0210] For specificity ELISAs on purified human and mouse IgGs, a 384-well plate was coated with a panel of purified human or mouse antigens at 88 ng per well and incubated overnight at 4°C. The plate was blocked and washed as described above, then 22 µL of

purified mouse or human anti-PCSK9 antibody diluted to 2 µg/mL in PBS was added to each well. The plate was incubated for 1 hr at 37°C then washed with PBST. Anti-mouse Fc antibody (Jackson ImmunoResearch Labs #115-035-071) or anti-human kappa antibody (Sigma #A7164) conjugated to HRP was diluted 1:5000 in PBS (25 µL) and added to each well. The plate was incubated for 1 hr at room temperature, then washed and developed as described above.

Colony lift binding assay (CLBA)

[0211] Screening of Humaneered™ libraries of Fab fragments was carried out essentially as described in (U.S. Patent Publ. 2005/0255552 and 2006/0134098) using nitrocellulose filters coated with PCSK9-His6 at 6 µg/mL. Fabs bound to the antigen-coated filter were detected using an alkaline phosphatase-conjugated anti-human kappa light chain antibody (Sigma #A3813) diluted 1:5000 in PBST, and blots were developed with DuoLux chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase (Vector Laboratories #SK-6605).

Generation of biotinylated recombinant PCSK9 and affinity measurements

[0212] PCSK9 with C-terminal Avi- (for site-directed biotinylation) and His6 (SEQ ID NO:57) tags (PCSK9-Avi-His6) was generated by inserting an EcoRI restriction site between the gene encoding PCSK9 and the His6 (SEQ ID NO:57) tag in the pRS5a/PCSK9 plasmid; expresses amino acids 31-692 of PCSK9 Uniprot Accession Q8NBP7 with a C-terminal His6 (SEQ ID NO:57) tag). Oligonucleotides encoding the Avi tag (amino acid sequence: GGGLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO:63) and flanked with EcoRI overhangs were phosphorylated with T4 polynucleotide kinase (Invitrogen), annealed, and subsequently ligated into pRS5a/PCSK9 using the newly inserted EcoRI site. Clones containing the Avi tag were verified by sequence analysis. Expression of PCSK9-Avi-His6 was performed in the 293 Freestyle Expression System (Invitrogen), and secreted recombinant protein was purified using Ni-NTA resin (QIAGEN). Following purification, PCSK9-Avi-His6 protein was dialyzed against 10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl. The protein was biotinylated in vitro with biotin-protein ligase (Avidity) according to the manufacturer's protocol. Upon completion, the reaction was dialyzed against PBS pH 7.2, and biotinylation was verified by Western blot, probing with HRP-conjugated streptavidin.

[0213] The binding kinetics of IgGs and Fab fragments were analyzed using a Solution Equilibrium Titration ("SET") assay. Briefly, serial dilutions of hPCSK9 were added to 60 pM IgG or Fab and incubated overnight. A 96-well Standard Bind microtiter plate (Meso Scale Discovery) was coated with 1 µg/ml hPCSK9 and incubated overnight, washed with

PBS/0.05% (w/v) Tween 20, blocked with PBS/5% (w/v) BSA, and washed again. The antibody-antigen preparation was added to the PCSK9-coated Standard Bind plate and incubated for 30 min at room temperature. After three additional washing steps, Sulfo-Tag-labeled goat-anti-human-detection antibody (R32AJ-5, Meso Scale Discovery) was added and incubated one hour at room temperature. After washing the plate three times, Read Buffer (Meso Scale Discovery) was added and electrochemiluminescence (ECL) signals were measured by a Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). ECL data were processed with the excel add-in XLfit 4.3.2 (ID Business Solutions) using the fitting model applicable for antibodies described in Piehler, *et al.*, (1997) *J Immunol Methods* 201:189-206. High affinity binding was observed between human PCSK9 and the antibodies LGT209, LGT210, and LGT211 in solution, with KD values of 150-190 pM calculated for each.

Antibody production and purification

[0214] Fully Humaneered™ NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT211 antibodies (silent IgG1 kappa) were produced by co-transfection of vectors as follows into 293 Freestyle cells using 293fectin transfection reagent (Invitrogen #51-0031) according to the manufacturer's protocol.

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

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

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

[0215] Antibody was purified from 293 Freestyle cell supernatants using a 5-mL HiTrap Protein A HP column (GE Healthcare #17-0403-03). Antibody was eluted using IgG Elution Buffer (Pierce #21004), and buffer exchanged into PBS by dialysis. Protein A affinity chromatography was performed on an AKTAFPLC liquid chromatography system (GE Healthcare).

Epitope competition assay

[0216] Competition between the original mouse antibody NVP-LFU720 and its Humaneered™ derivative NVP-LGT209 for epitope binding on PCSK9 was assayed using the ForteBio Octet QK system and Streptavidin High Binding Biosensors coated with biotinylated PCSK9-Avi-His6. Three different antibodies were then bound to separate PCSK9-coated sensors to saturation: mouse LFU720, fully human LGT209, or the control mouse antibody 7D16 (known to have a separate epitope from that of LFU720). Next, all

sensors were dipped into wells containing LFU720 mouse antibody to determine whether the first antibody could block LFU720 binding.

Results

Murine and reference V-region amino acid sequences

5 [0217] RT-PCR products from hybridoma cells that express NVP-LFU720 were sequenced, and this sequence was largely (95% or greater) verified at the protein level using a ThermoElectron LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer. The heavy and light chain variable regions of LFU720 were then cloned into KaloBios vectors in order to create the reference Fab SR032. The first amino acid in NVP-LFU720 Vk had to be changed from a glutamine
10 (Q) to a glutamic acid (E) to enable cloning into KaloBios vectors for generation of the reference Fab SR032; therefore, the SR032 Vk has glutamic acid at the first Vk position. The Fab SR032 has intact murine V-regions from NVP-LFU720 fused with human constant regions and was purified from *E. coli*. In a dilution ELISA test of PCSK9-His6 antigen binding, the cloned SR032 reference Fab produced binding curves that were dependent on
15 Fab concentration. In addition to the reference Fab (SR032), an optimized reference Fab, SR038, was constructed. Several framework amino acid residues in SR032 were changed to human germline in SR038.

Reference and optimized reference Fab affinity analysis

[0218] The human germline residues incorporated into the optimized reference Fab SR038
20 in FR1 and FR3 are those specified by the PCR primers used to amplify the human V-segment repertoire and thus are present in all members of the Humaneered™ V-region libraries. The optimized reference Fab is constructed to assess whether or not any of the changes to human germline alter the properties of Fab binding. By dilution ELISA using purified Fabs, the affinities of SR032 and SR038 for recombinant PCSK9 antigen were
25 determined to be identical, indicating that the amino acid changes in SR038 are tolerated.

Library construction and selection of fully Humaneered™ Fabs

[0219] Heavy and light chain front-end and middle cassette libraries subgroup-restricted to Vh1 or Vk3 were generated and screened by CLBA. For Vh, front-end cassettes which supported binding to PCSK9 antigen were identified by colony-lift binding assay, but Vh
30 middle cassettes were not. For Vk, both front-end and middle cassettes were identified by colony lift, and in addition, some full Vk clones were identified (due to contamination of the Vk front-end library with full-chain Vk clones). Many binders from each library reconfirmed

in an ELISA assay on Fab-containing cell supernatants, and several Fabs from each library were purified from periplasmic fractions and rank-ordered by affinity using Forte analysis.

[0220] Since no V-heavy middle cassettes that supported PCSK9 binding were identified, two mutagenic libraries were constructed which encoded either the parental murine residue or the closest human germline residue at all positions within the heavy chain CDR2 or FR3. Thus, an engineered human middle cassette library was built, screened, and antigen-binding clones identified. Changes to human germline in the Vh middle that supported binding in the context of individual clones were then combined to create one final middle cassette, and the affinity of a Fab containing this cassette in the context of the optimized reference Fab was confirmed to bind as well as the optimized reference Fab by Forte analysis.

[0221] From the libraries created, front-end and middle human cassettes that supported binding to PCSK9 antigen were successfully identified for both the heavy and light chains by CLBA. These binders were all confirmed by ELISA, then Fabs were purified and rank-ordered using the ForteBio Octet system. High-ranking cassettes for the heavy and light chains were combined into one final library by bridge PCR, and fully Humaneered™ Fabs that supported binding to PCSK9 were selected from this library by CLBA. In parallel with this, all the top-ranked cassettes or chains (the best Vh front-end, the engineered Vh middle, and the best full light chain) were combined together to create a single Fab SR066, which would be predicted to support high-affinity binding.

[0222] The sequences of the heavy and light chain variable regions for parent mouse mAb NVP-LFU720 and Humaneered™ Abs NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT211 are shown in Figures 1-4, respectively.

Testing the affinity of fully Humaneered™ Fabs for PCSK9 antigen using ForteBio Octet analysis

[0223] The Humaneered™ SR066 Fab and three Fabs pulled out of the final combinatorial library (#1-2, #3-2, and #4-2) were expressed and purified. The binding kinetics of these four human Fabs were then compared to the kinetics of the optimized reference Fab SR038 using the ForteBio Octet system (numerical data summarized in Table 1).

Table 1

Affinity of fully Humaneered™ Fabs for PCSK9

Fab	k_a	k_d	K_D
SR038	1.39E3	5.12E-4	3.69E-7

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

*** Not enough binding of the #4-2 Fab was detected to generate reliable kinetics data.

[0224] Protein concentration determination for these Fabs was difficult; as such, the off-rate (k_d) data are much more reliable than the on-rate (k_a) and K_D data (only off-rates are concentration-independent). All four of the Humaneered™ Fabs tested appeared to have off-rates that were 3- to 4-fold “worse” (i.e., faster) than that of the optimized reference Fab. This decrease in affinity was likely due to the heavy chain front-ends in these clones, as all of the Fab binders selected from the original heavy chain front-end cassette library appeared to have “worse” off-rates than the optimized reference Fab (data not shown). As the heavy chain front-end contains CDR1, changes made to this CDR in the Vh front-end cassettes were a potential cause for the decreased affinity of the final Humaneered™ Fabs. Of the fully Humaneered™ Fabs, SR066 had the best off-rate (Table 1), and there are three differences between SR066 and the reference (mouse) sequence in heavy chain CDR1. To test the idea that changes made to CDRH1 were responsible for the decrease in affinity seen in all of our Humaneered™ Fabs, we simultaneously changed two residues at a time in CDRH1 of SR066 back to match the original murine residues, and expressed and purified these altered Fabs for Forte kinetic analysis.

[0225] One Fab with two simultaneous changes in CDRH1 (SR079) (Table 2) significantly improved the binding kinetics of SR066 (numerical data are summarized in Table 3). In fact, the SR079 Fab appeared to have an off-rate equivalent to that of the optimized reference (mouse) Fab SR038.

Table 2

CDRH1 sequence of CDRH1-variant Fab SR079*

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

*Human (SR066-derived) or invariant residues are bolded; murine residues are normal font.

Table 3

Affinity of SR079 Fab for PCSK9

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

[0226] Humaneered™ Fabs SR066, #1-2, #3-2, and #4-2 contained an “Asn-Gly” (“NG”) amino acid sequence in CDRH2, which came from the original mouse antibody. This sequence is known to potentially undergo deamidation, an undesirable property for production. Therefore, at the same time as efforts were made to improve the affinity of the Humaneered™ SR066 Fab, two mutagenic libraries were constructed in the context of SR066, in which the “N” or the “G” were substituted with every possible amino acid except the original amino acid (e.g., in the “N removal library,” “N” was substituted with every amino acid except for “N”). Fab-containing cell supernatants from this library were then screened by ELISA to identify clones that no longer had the “NG” sequence but still retained the SR066 level of binding (which is less than that of the optimized reference Fab SR038). The “N removal library” did not yield any Fabs that bound to the same extent as SR066, but the “G removal library” yielded Fabs with sufficient levels of binding that had a number of different substitutions at the “G” position. Of these, Fabs that had “NG” to “NE,” “NA,” and “NM” changes were chosen for purification and Forte kinetic analysis and found to have similar kinetics to that of the parent Fab SR066.

Engineering 7472 human IgG to improve affinity*Vk engineering*

[0227] In order to create a completely human IgG, the Vh sequence of SR079 (modified version of SR066 that has improved affinity) up to CDRH2 was amplified and stitched to the sequence of a “G removal library” clone (containing “NE” in CDRH2) from CDRH2 through most of FR4 by bridge PCR. This Vh sequence was cloned into pRS5a-hIgG1 LALA + KpnI (silent IgG1 cloning vector that had been modified to add a KpnI site in FR4 without affecting the amino acid sequence of the Vh) at NruI (5′) and KpnI (3′) to create pSR074. The Vk (from FR1 up to partway through FR4) from SR066 was amplified and cloned into pRS5a-hkappa at AgeI and BsiWI to create pSR072. These vectors were verified by sequencing and co-transfected into 293 Freestyle cells. This IgG (referred to as “7472”) was purified from antibody-containing cell media. Surprisingly, antibody 7472 had a

significantly slower on-rate than the parental mouse antibody LFU720 by Biacore analysis (not shown). By interchanging each human chain with the complementary parental mouse chain, it was determined that this on-rate defect is due to a problem with the human light chain. Alterations were made to the pSR072 human light chain to rescue affinity (Table 4):

- 5 the first four residues of the light chain were converted back to mouse sequence, and residues in the second half of CDR1 were converted back to mouse. This light chain was cloned into pRS5a-hkappa as described above to generate pJG10 and pJG01, and a full IgG was generated by co-transfection of pSR074 (Hc vector) and pJG10 (Lc vector) or pJG01 (Lc vector). Together, these changes partially rescued the affinity of the Humaneered™ antibody
- 10 as determined by Biacore.

Table 4

Changes made to IgG 7472 light chain

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

- 15 **[0228]** Table 4 shows alignments of portions of the light chains of the human antibody 7472, the parental mouse antibody LFU720, and the light chain encoded by pJG10. This portion is identical to the light chain encoded by pJG01. The light chain vectors were used for expression of the final Humaneered™ antibodies NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT-211.

20 *Affinity Maturation of CDRH3*

- [0229]** In parallel with the light chain alterations, a Fab library was constructed to affinity mature CDR3 of the pSR074 heavy chain. In this library, CDR3 residues were substituted singly with every other amino acid, excluding the original residue. This library was screened by CLBA, binders were verified by ELISA, and the resultant Fabs were purified and tested
- 25 by bio-layer interferometry to determine whether they had improved binding kinetics relative to the parental human Fab.

[0230] One CDRH3 substitution was identified which did significantly improve affinity: an A to N change (Table 5). This change was subsequently made in the context of the pSR074 heavy chain IgG expression plasmid; this new construct was called pJG04. The final

Humaneered™ antibody NVP-LGT209 (LGT209) was generated by co-transfection of pJG04 (Hc) and pJG10 and subsequent purification. The final Humaneered™ antibody NVP-LGT210 (LGT210) was generated by co-transfection of pJG04 (Hc) and pJG01 and subsequent purification. This change was not introduced into antibody NVP-LGT211 (LGT211).

Table 5**Change made to IgG 7472 heavy chain CDR3**

	CDRH3 sequence	SEQ ID NO:
7472	CARSYYYYAMDY	<u>72</u>
LFU720	CARSYYYYAMDY	<u>72</u>
pJG04	CARSYYYNNMDY	<u>73</u>

- 10 **[0231]** Table 5 shows alignments of heavy chain CDR3 of the human antibody 7472, the parental mouse antibody LFU720, and the heavy chain encoded by pJG04 (heavy chain vector used for expression of the final Humaneered™ antibodies NVP-LGT209 and NVP-LGT210). The A to N substitution is underlined.

Analysis of binding kinetics of NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT211 using the
 15 Solution Equilibrium Titration (SET) system

[0232] Using the SET assay, the binding affinities of the NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT211 antibodies to human PCSK9 were determined to be between 150-190 pM as indicated in Table 6. This suggests high affinity interaction between the antibodies and PCSK9 in solution.

Table 6

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

Analysis of antigen specificity of NVP-LGT209 by ELISA

[0233] In order to test whether the antigen specificity of the parental mouse antibody LFU720 was retained in the final Humaneered™ IgGs, LGT209, LGT210 and LGT211, binding of the antibodies to a panel of human and mouse antigens (as well as human PCSK9) was tested in an ELISA assay. The results of this assay (Figures 5A-C) show that LGT209, LGT210 and LGT211 retain high specificity for PCSK9, similar to the murine antibody LFU720.

Antibody binding to human and cynomolgus macaque Pcsk9 protein in ELISA

[0234] LGT209, LGT210 and LGT211 were evaluated for specific binding to human and cynomolgus macaque (cyno) Pcsk9. This ELISA assay shows that, like the parental mouse antibody LFU720, the Humaneered™ antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 are able to bind both human and cyno Pcsk9 in a similar manner (Figures 6A-C).

Bio-layer interferometry-based epitope competition assay

[0235] In order to test whether the epitope specificity of the parent murine antibody NVP-LFU720 was retained in the final Humaneered™ antibodies LGT209, LGT210 and LGT211, a competition assay using the ForteBio Octet system was developed. The Humaneered™ antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 block binding of the parental mouse antibody NVP-LFU720, indicating that the Humaneered™ antibodies retain the epitope specificity of the original murine antibody. Similar results were obtained when the order of loading of antibodies was switched, *i.e.*, NVP-LFU720 bound first, followed by the Humaneered™ antibody.

Amino acid sequence of Humaneered™ antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 and percent identity to human germline sequence

[0236] The variable region amino acid sequences of final Humaneered™ IgG LGT209, LGT210 and LGT211 are shown in Figures 2-4, respectively; CDRs are underlined and in bold. Nucleotide sequences are included in the sequence listing.

[0237] The percent identity to human germline sequences for antibodies LGT209, LGT210 and LGT211 was determined by aligning the Vh and Vk amino acid sequences against a single human germline sequence (Vh1 1-02 and Vk3 A27, respectively; Table 7). Residues in CDRH3 and CDRL3 were omitted from the calculation for each chain.

Table 7

**Percent identity of antibodies LGT209, LGT210 and LGT211
to human germline sequences**

Vh versus Vh1 1-02	Vk versus Vk3 A27
89%	91%

[0238] Additional information regarding the functional characterization of the humanized antibodies is discussed in the figure legends of Figures 8-14.

Example 3: Mutational Analyses of PCSK9 Antagonist Antibodies NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP-LGT211

[0239] Variants of PCSK9 Antagonist Antibodies NVP-LGT209, NVP-LGT210 and NVP LGT211 were evaluated for their ability to bind to PCSK9. The results are summarized as follows:

[0240] With respect to the heavy chain CDR1, **TM_YMS** (SEQ ID NO:66), only clones that contain the original mouse residues (in bold) retain the binding kinetics of mouse Ab (as determined by biolayer interferometry analysis). Therefore, these residues within the heavy chain CDR1 play a role in binding.

[0241] With respect to the heavy chain CDR2, **RIDPANE_HTN_YAQKFQ_G** (SEQ ID NO:74), residues in bold were not altered in antibody binders pulled out of a library encoding either original (mouse) residue or the corresponding residue in the closest human germline sequence at each position (screened by ELISA). Therefore, the bolded residues play a role in binding. Conservative substitutions are tolerated at the position indicated by the underlined Glu residue, for example, this position can be A, E or D, as determined by ELISA and confirmed by biolayer interferometry.

[0242] With respect to the heavy chain CDR3, **SY_YY_(A/N)MD_Y** (SEQ ID NO:75), residues in bold were not altered in clones pulled out of an affinity maturation library encoding all amino acid possibilities (excluding the original aa) at each position. Therefore, the bolded residues play a role in binding. Conservative substitutions are tolerated at the position indicated by the underlined Ala or Asn residue, for example, this position can be A, N or Q, as determined by Biacore. Conservative substitutions are tolerated at the position indicated by the underlined Tyr residue, for example, this position can be A, F, S, V or Y, as determined by Biacore.

[0243] With respect to the light chain FR1, (E/Q)IV(M/L)TQSPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO:76), conservative substitutions are tolerated at the underlined positions 1 and 4, as determined by Biacore. For example, the amino acid at position 1 can be A, D, E, N or Q. The amino acid at position 4 can be V, I, L or M. Positions 1-4 as QIVL (SEQ ID NO:69) (as in the mouse parent LFU720, LGT209 and LGT211 Vk) have improved binding over positions 1-4 as EIVM (SEQ ID NO:67) (as in LGT210 Vk), as determined by Biacore.

[0244] With respect to the light chain CDR1, RASQSVSYM**H** (SEQ ID NO:71), the spacing of the bolded residues had consequences for binding, as a human clone with 2 extra amino acids in this portion of Lc CDR1 was compromised in affinity. Therefore, the bolded residues play a role in binding.

[0245] With respect to the light chain CDR3, **LQWSSDPPT** (SEQ ID NO:26), changes to human germline at these positions are not tolerated, as determined by ELISA. Therefore, the bolded residues play a role in binding.

It is understood that the examples and embodiments described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims. All publications, patents, patent applications, and sequence accession entries cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

WHAT IS CLAIMED IS:

- 1 1. An antibody that binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
2 (PCSK9), wherein the antibody:
 - 3 a) does not block PCSK9 binding to the low density lipoprotein receptor
4 (LDLR) and
 - 5 b) inhibits PCSK9-mediated degradation of LDLR.
- 1 2. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds to at least one
2 amino acid within residue positions 680-692 of human PCSK9.
- 1 3. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds to human PCSK9
2 with an equilibrium dissociation constant (K_D) of about 500 pM or less.
- 1 4. The antibody of claim 1, wherein the antibody has an *in vivo* half-life
2 of at least 7 days.
- 1 5. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises
 - 2 (a) a heavy chain variable region comprising a human heavy chain V-segment,
3 a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3), and a heavy chain framework
4 region 4 (FR4), and
 - 5 (b) a light chain variable region comprising a human light chain V-segment,
6 a light chain CDR3, and a light chain FR4, wherein
 - 7 i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence
8 SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO:14); and
 - 9 ii) the light chain CDR3 variable region comprises the amino acid
10 sequence LQWSSDPPT (SEQ ID NO:26).
- 1 6. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain V-segment has at
2 least 85% sequence identity to SEQ ID NO:28, and wherein the light chain V-segment has at
3 least 85% sequence identity to SEQ ID NO:31.
- 1 7. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain V-segment has at
2 least 85% sequence identity to SEQ ID NO:27, and wherein the light chain V segment has at
3 least 85% sequence identity to the amino acid selected from the group consisting of SEQ ID
4 NO:29 and SEQ ID NO:30.
- 1 8. The antibody of claim 5, wherein:

i) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13; and

ii) the light chain CDR3 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:26.

9. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain FR4 is a human germline FR4.

10. The antibody of claim 9, wherein the heavy chain FR4 is SEQ ID NO:35.

11. The antibody of claim 5, wherein the light chain FR4 is a human germline FR4.

12. The antibody of claim 11, wherein the light chain FR4 is SEQ ID NO:39.

13. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain V-segment and the light chain V-segment each comprise a complementarity determining region 1 (CDR1) and a complementarity determining region 2 (CDR2); wherein:

i) the CDR1 of the heavy chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:8;

ii) the CDR2 of the heavy chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:11;

iii) the CDR1 of the light chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:22; and

iv) the CDR2 of the light chain V-segment comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:25.

14. The antibody of claim 13, wherein

i) the CDR1 of the heavy chain V-segment comprises SEQ ID NO:7;

ii) the CDR2 of the heavy chain V-segment comprises SEQ ID NO:10;

iii) the heavy chain CDR3 comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13;

iv) the CDR1 of the light chain V-segment comprises SEQ ID NO:21;

v) the CDR2 of the light chain V-segment comprises SEQ ID NO:24; and

vi) the light chain CDR3 comprises SEQ ID NO:26.

1 15. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region has
2 at least 90% amino acid sequence identity to the variable region of SEQ ID NO:40 and the
3 light chain variable region has at least 90% amino acid sequence identity to the variable
4 region of SEQ ID NO:41.

1 16. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region has
2 at least 95% amino acid sequence identity to the variable region of SEQ ID NO:40 and the
3 light chain variable region has at least 95% amino acid sequence identity to the variable
4 region of SEQ ID NO:41.

1 17. The antibody of claim 5, wherein the antibody comprises a heavy chain
2 comprising SEQ ID NO:40 and a light chain comprising SEQ ID NO:41.

1 18. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region has
2 at least 90% amino acid sequence identity to the variable region selected from the group
3 consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4 and the light chain variable region has at least
4 90% amino acid sequence identity to the variable region selected from the group consisting of
5 SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:18.

1 19. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region has
2 at least 95% amino acid sequence identity to the variable region selected from the group
3 consisting of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4 and the light chain variable region has at least
4 95% amino acid sequence identity to the variable region selected from the group consisting of
5 SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:18.

1 20. The antibody of claim 5, wherein the heavy chain variable region
2 comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2 and
3 SEQ ID NO:4 and the light chain variable region comprises the amino acid sequence selected
4 from the group consisting of SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:18.

1 21. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a FAb' fragment.

1 22. The antibody of claim 1, wherein the antibody is an IgG.

1 23. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a single chain
2 antibody (scFv).

1 24. The antibody of claim 1, wherein the antibody comprises human
2 constant regions.

1 25. The antibody of claim 1, wherein the antibody is linked to a carrier
2 protein.

1 26. The antibody of claim 1, wherein the antibody is PEGylated.

1 27. An antibody that specifically binds PCSK9, wherein the antibody
2 comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein the heavy
3 chain variable region and the light chain variable region each comprise the following three
4 complementarity determining regions (CDRs): CDR1, CDR2 and CDR3; wherein:

5 i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid
6 sequence of SEQ ID NO:8;

7 ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid
8 sequence of SEQ ID NO:11;

9 iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid
10 sequence of SEQ ID NO:14;

11 iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid
12 sequence of SEQ ID NO:22;

13 v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid
14 sequence of SEQ ID NO:25;

15 vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid
16 sequence of SEQ ID NO:26.

1 28. The antibody of claim 27, wherein:

2 i) the CDR1 of the heavy chain variable region comprises the amino acid
3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7;

4 ii) the CDR2 of the heavy chain variable region comprises the amino acid
5 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:9 and SEQ ID NO:10;

6 iii) the CDR3 of the heavy chain variable region comprises the amino acid
7 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:13;

8 iv) the CDR1 of the light chain variable region comprises the amino acid
9 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:21;

10 v) the CDR2 of the light chain variable region comprises the amino acid
11 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:23 and SEQ ID NO:24;

12 vi) the CDR3 of the light chain variable region comprises the amino acid
13 sequence of SEQ ID NO:26.

1 29. A composition comprising an antibody of claim 1 and a
2 physiologically compatible excipient.

1 30. The composition of claim 29, wherein the composition further
2 comprises a second agent that reduces low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels in
3 an individual.

1 31. The composition of claim 30, wherein the second agent is a statin.

1 32. The composition of claim 31, wherein the statin is selected from the
2 group consisting of atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin,
3 pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.

1 33. The composition of claim 30, wherein the second agent is selected
2 from the group consisting of fibrates, niacin and analogs thereof, cholesterol absorption
3 inhibitors, bile acid sequestrants, thyroid hormone mimetics, a microsomal triglyceride
4 transfer protein (MTP) inhibitor, a diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an
5 inhibitory nucleic acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100.

1 34. A method of reducing LDL-C in an individual in need thereof, the
2 method comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of claim
3 1 to the individual, thereby reducing LDL-C in the individual.

1 35. The method of claim 34, wherein the individual is hyporesponsive or
2 resistant to statin therapy.

1 36. The method of claim 34, wherein the individual is intolerant to statin
2 therapy.

1 37. The method of claim 34, wherein the individual has a baseline LDL-C
2 level of at least about 100 mg/dL.

1 38. The method of claim 34, wherein the individual has familial
2 hypercholesterolemia.

- 1 39. The method of claim 34, wherein total cholesterol is reduced with
2 LDL-C.
- 1 40. The method of claim 34, wherein the individual has triglyceridemia.
- 1 41. The method of claim 34, wherein the individual has a gain-of-function
2 PCSK9 gene mutation.
- 1 42. The method of claim 34, wherein the individual has drug-induced
2 dyslipidemia.
- 1 43. The method of claim 34, further comprising administering a
2 therapeutically effective amount of a second agent effective in reducing LDL-C to the
3 individual.
- 1 44. The method of claim 43, wherein the second agent is a statin.
- 1 45. The method of claim 44, wherein the statin is selected from the group
2 consisting of atorvastatin, cerivastatin, fluvastatin, lovastatin, mevastatin, pitavastatin,
3 pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin.
- 1 46. The method of claim 43, wherein the second agent is selected from the
2 group consisting of fibrates, niacin and analogs thereof, cholesterol absorption inhibitors, bile
3 acid sequestrants, thyroid hormone mimetics, a microsomal triglyceride transfer protein
4 (MTP) inhibitor, a diacylglycerol acyltransferase (DGAT) inhibitor, an inhibitory nucleic
5 acid targeting PCSK9 and an inhibitory nucleic acid targeting apoB100.
- 1 47. The method of claim 43, wherein the antibody and the second agent
2 are co-administered as a mixture.
- 1 48. The method of claim 43, wherein the antibody and the second agent
2 are co-administered separately.
- 1 49. The method of claim 34, wherein the antibody is administered
2 intravenously.
- 1 50. The method of claim 34, wherein the antibody is administered
2 subcutaneously.

1/18

*Figure 1***Variable region sequences of parent mouse mAb LFU720****LFU720 Heavy Chain Variable Region**

EVQLQQSGAELMKPGASVKLSCTASGFNIKDMYMSWVRQRPEQGLEWIGRIDPAN
GHTNYDPKFQAKATITTTDTSSKTAYLHLSSLTSED¹AVYYCARSYYYAMDYWGQ
GTSVTVSS

LFU720 Light (kappa) Chain Variable Region

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSVSSYMHHWYQQKPGSSPRLWIYLTFNLA
SGVPARFSGSGSGTSSLSISSMEAE²DAATYYCLOWSSDPPTFGSGTKLEIK

2/18

*Figure 2***Variable region sequences of Ab NVP-LGT209****pJG04 (Vh) +pJG10 (Vk)****pJG04 Vh**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRRIDPA
NEHTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARSYYYYNMDYW
GQGTLLTVSS

pJG10 Vk

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

3/18

*Figure 3***Variable region sequences of Ab NVP-LGT210****pJG04 (Vh) +pJG01 (Vk)****pJG04 Vh**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPA
NEHTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARSYYYYNMDYW
GQGLTVTVSS

pJG01 Vk

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATG
IPDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLOWSSDPPTFGQGTKLEIK

4/18

*Figure 4***Variable region sequences of Ab NVP-LGT211****pSR74 (Vh) +pJG10 (Vk)****pSR074 Vh**

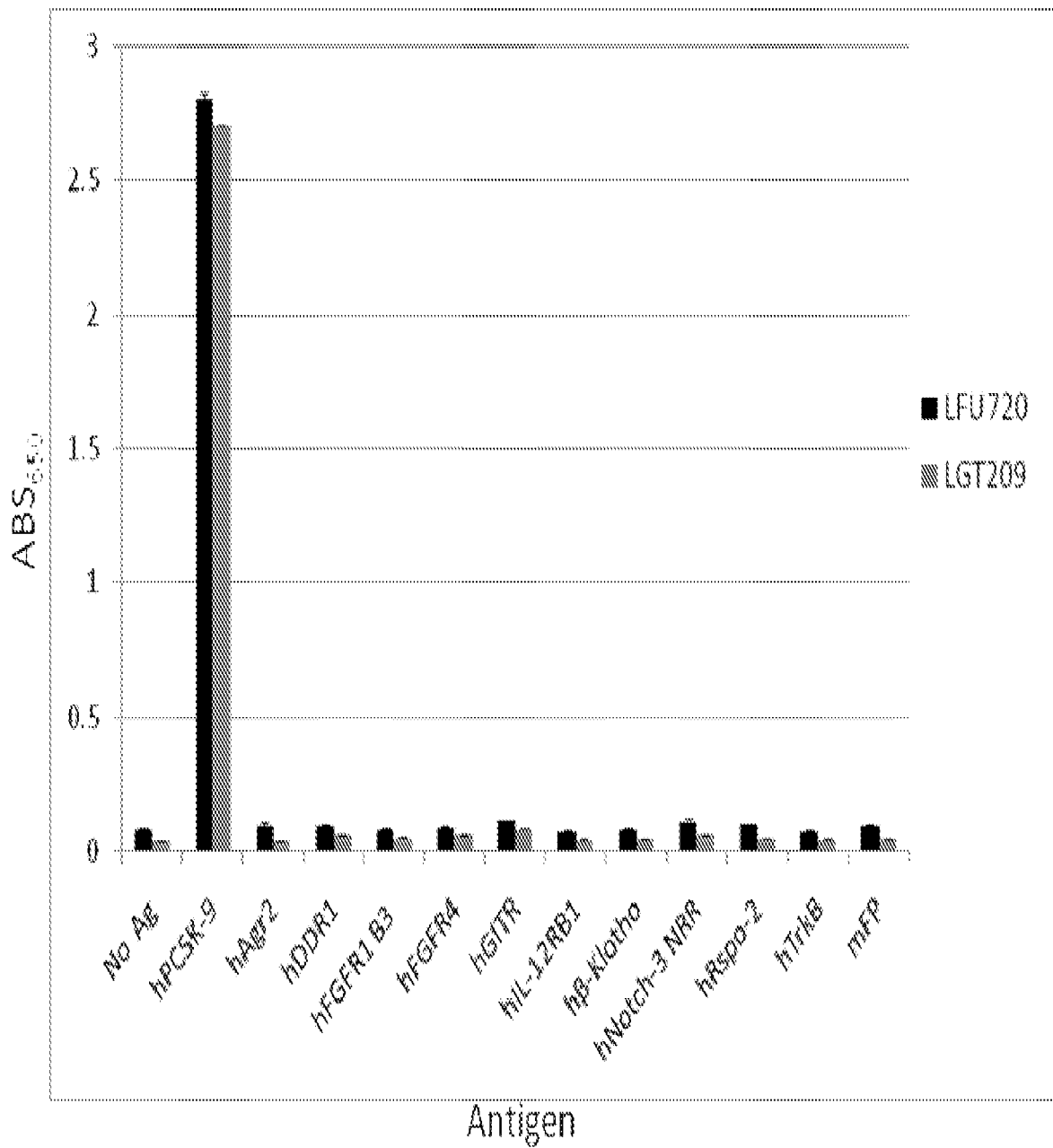
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPA
NEHTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARSYYYAMDYW
GQGLTVTVSS

pJG10 Vk

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFERRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLQWSSDPPTFGQGTKLEIK

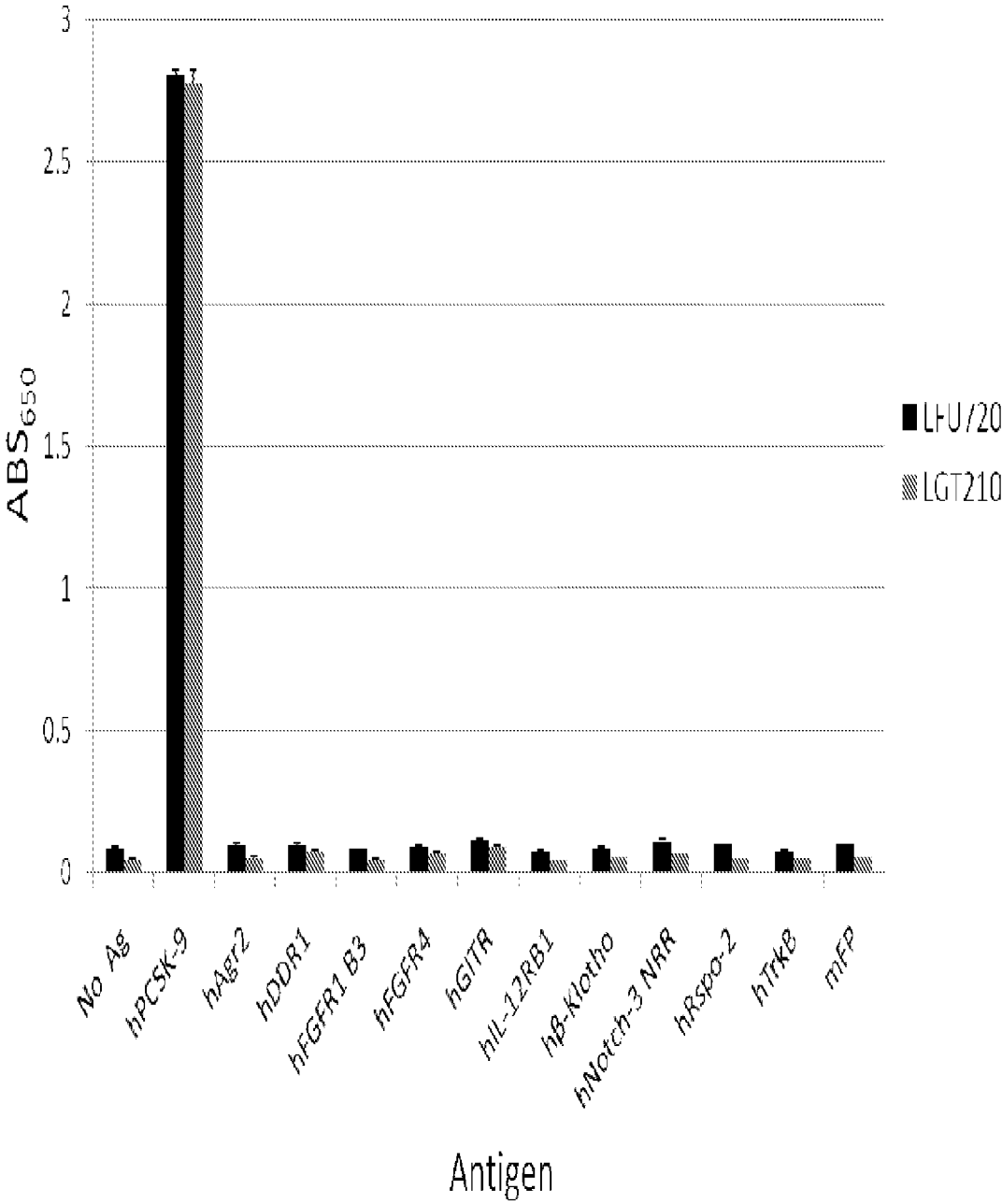
5/18

Figure 5A



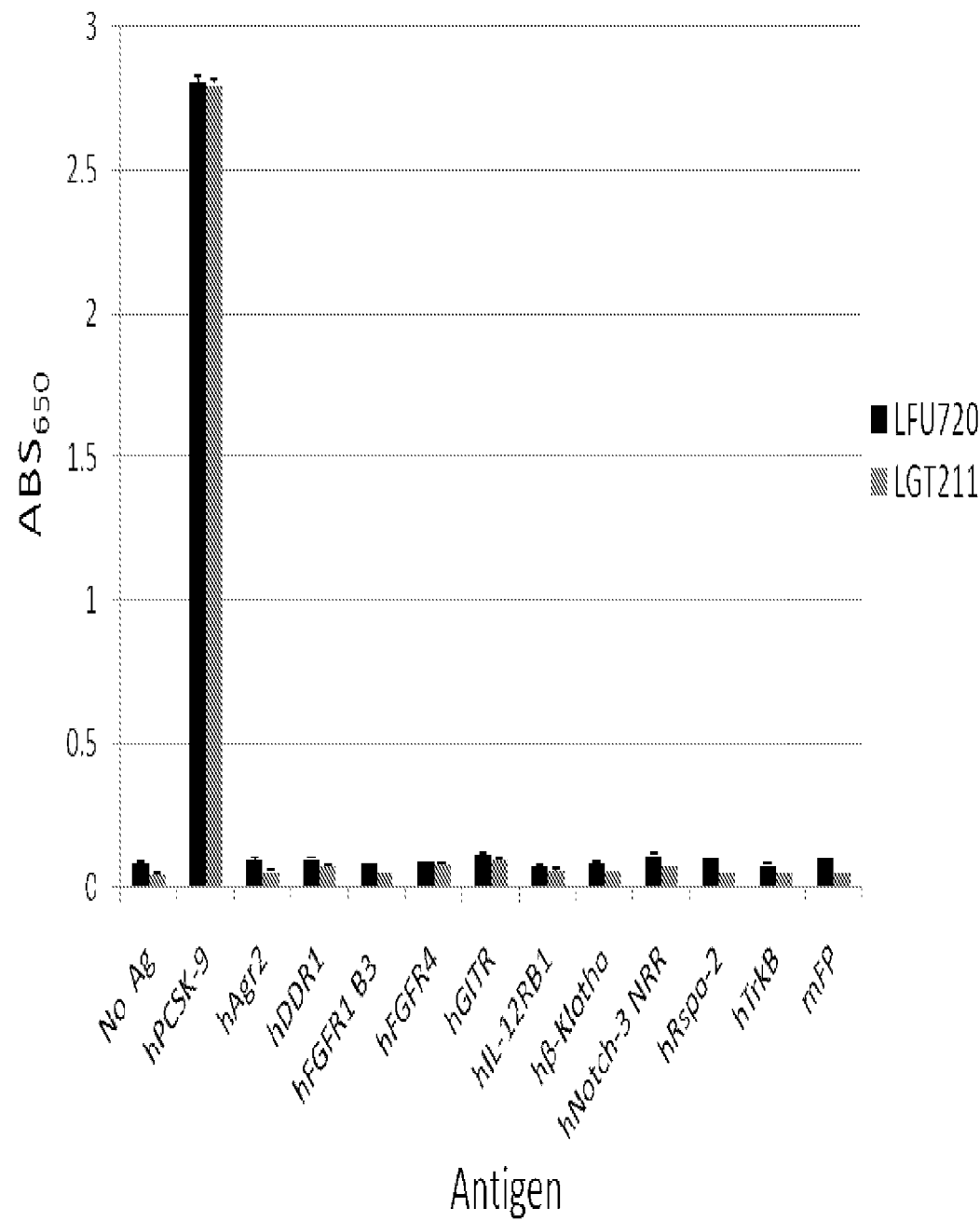
6/18

Figure 5B



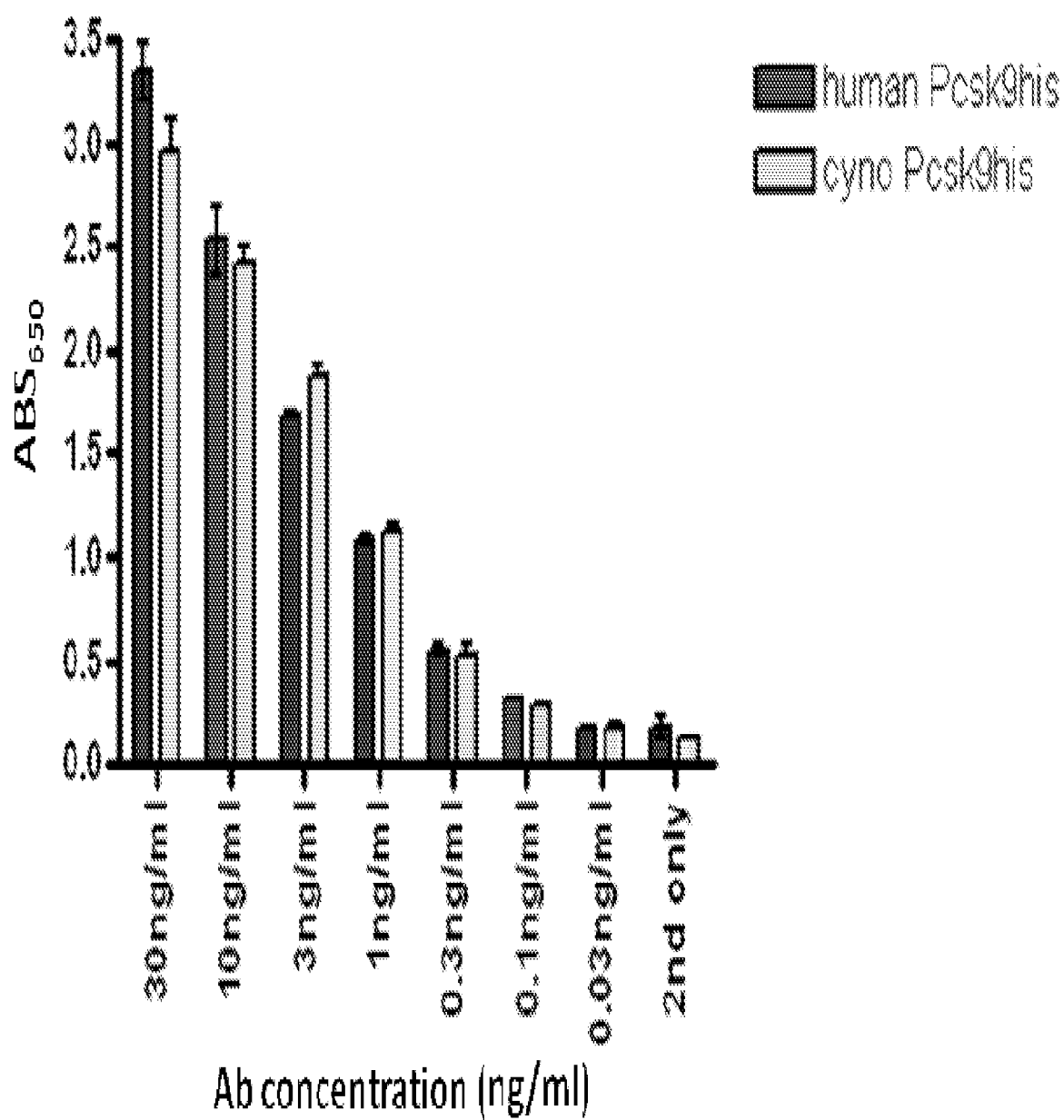
7/18

Figure 5C



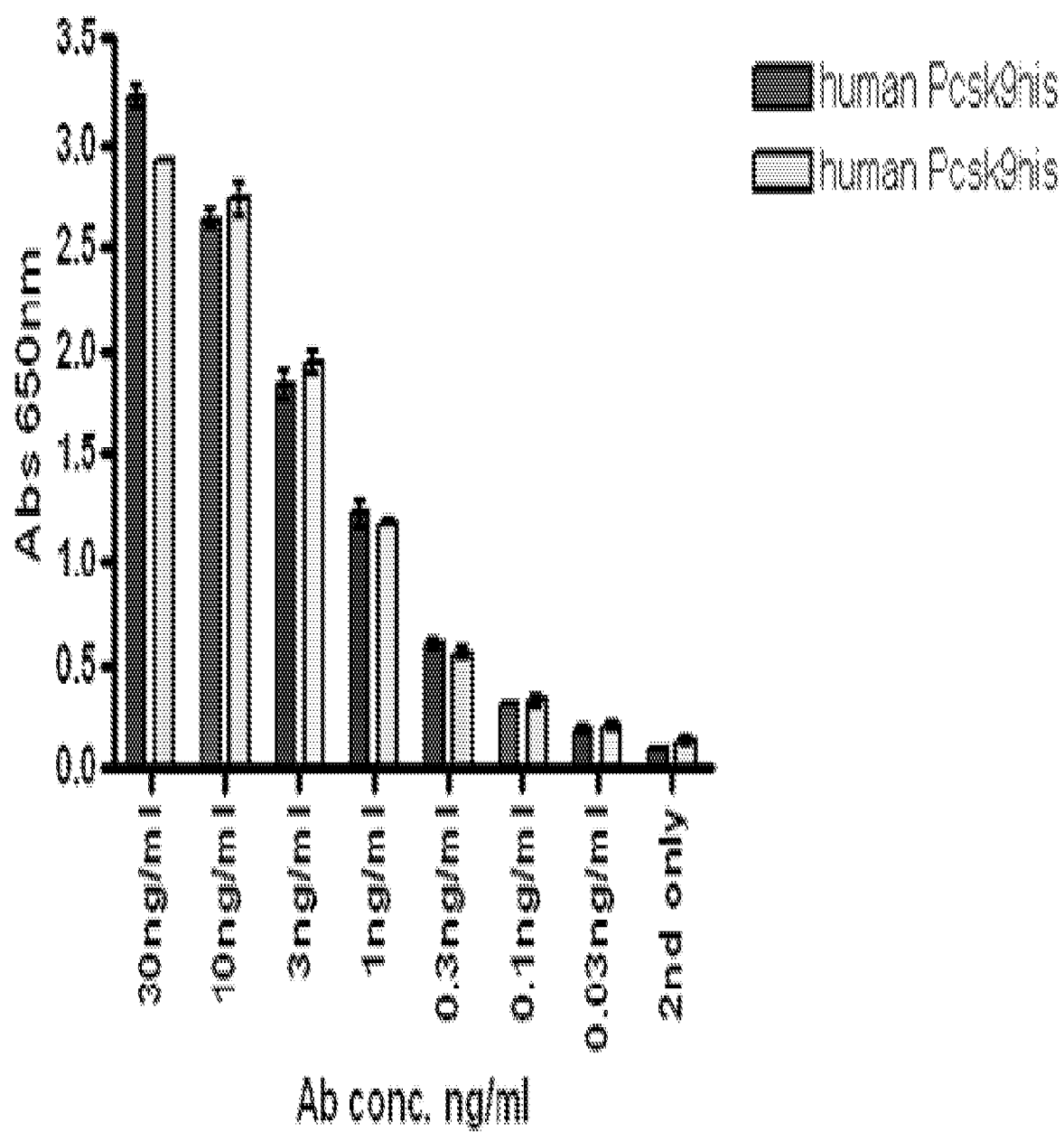
8/18

Figure 6A



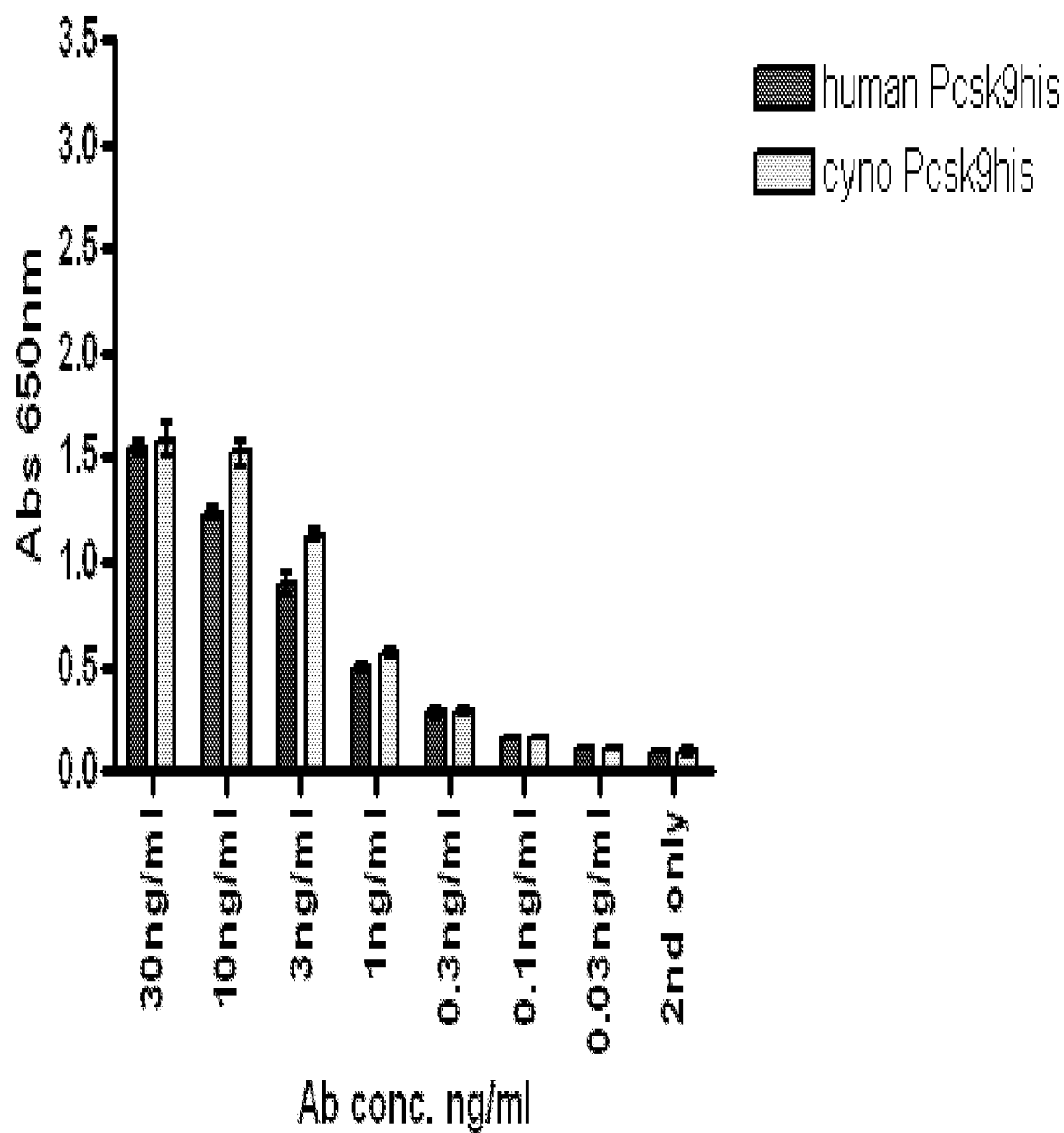
9/18

Figure 6B

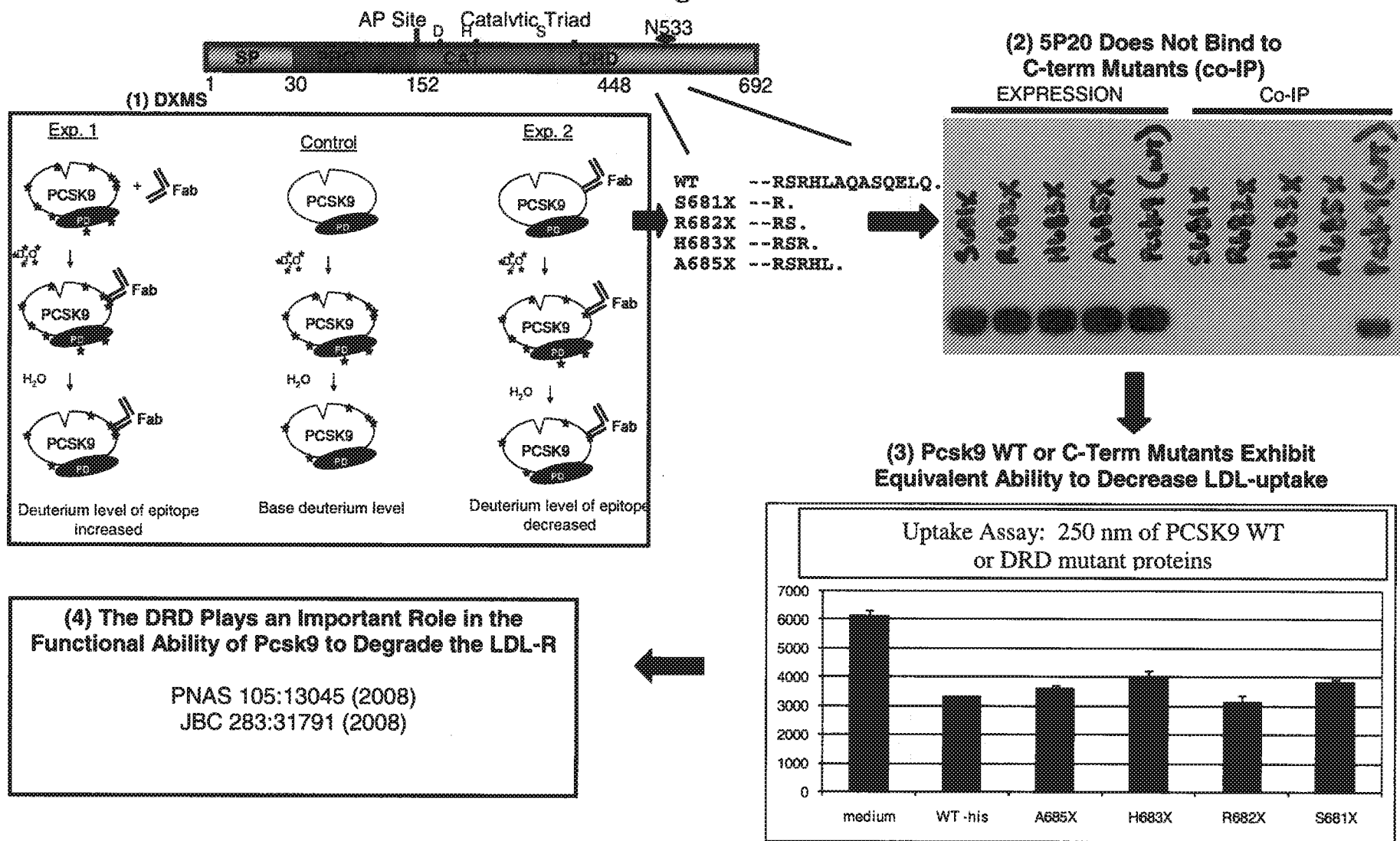


10/18

Figure 6C



11/18
Figure 7

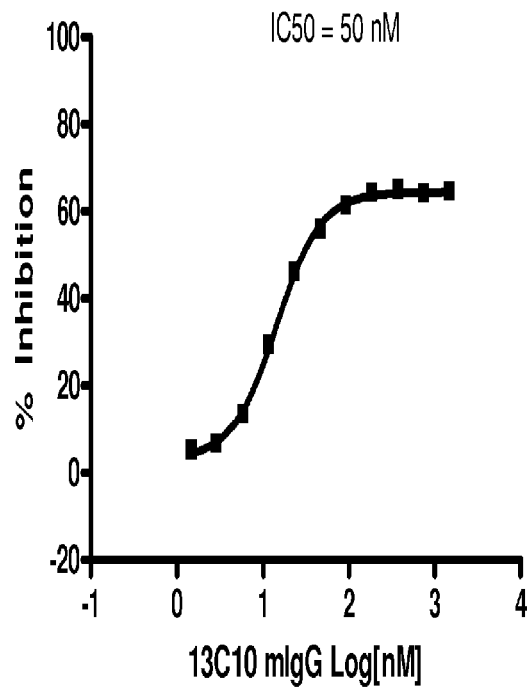
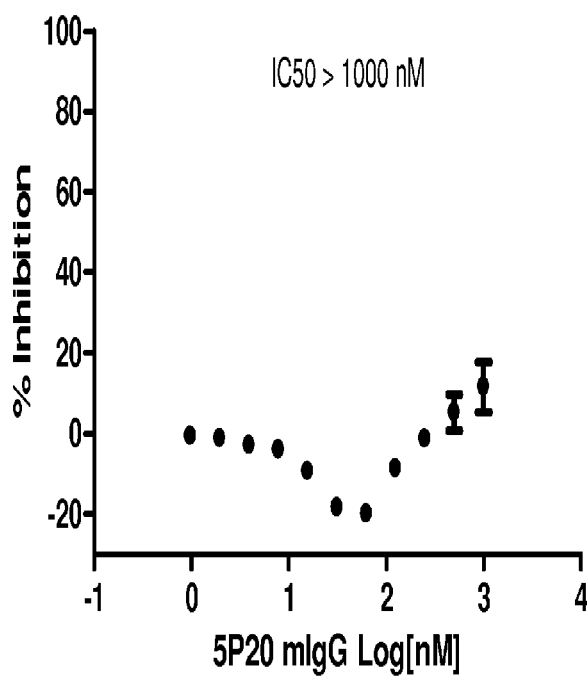


12/18

Figure 8

5P20 (non-FRET disrupter)

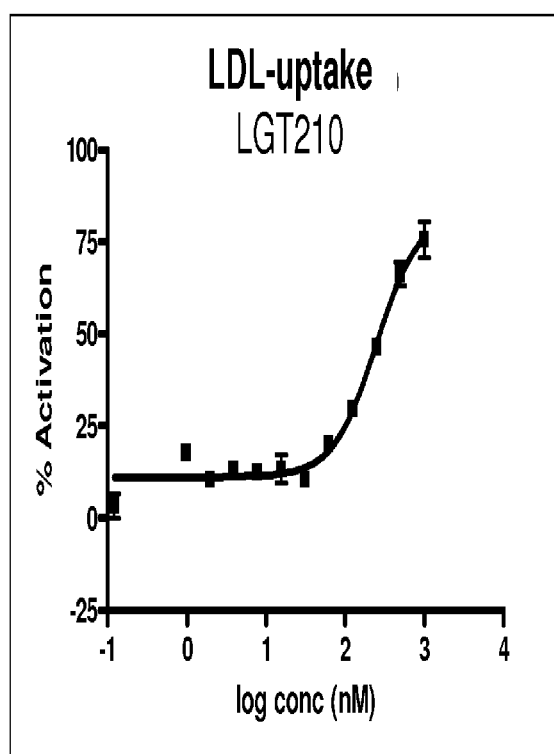
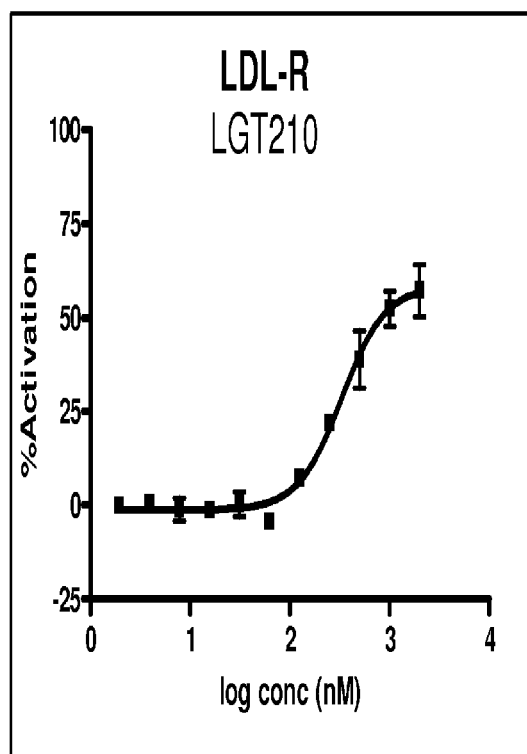
13C10 (FRET disrupter)



13/18

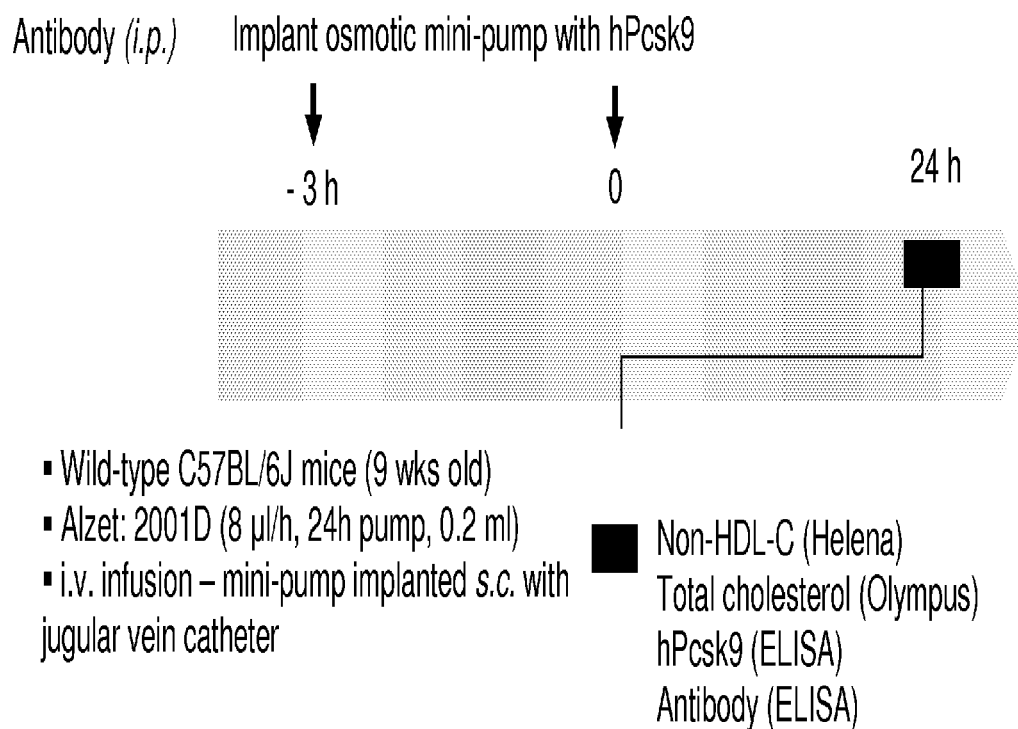
Figure 9

Antibody	LDL-R Elevation	LDL- uptake
LGT209	480 ± 64	255 ± 25
LGT210	480 ± 48	259 ± 22
LGT211	430 ± 60	230 ± 17
NVP-LFU720	520 ± 28	294 ± 62



14/18

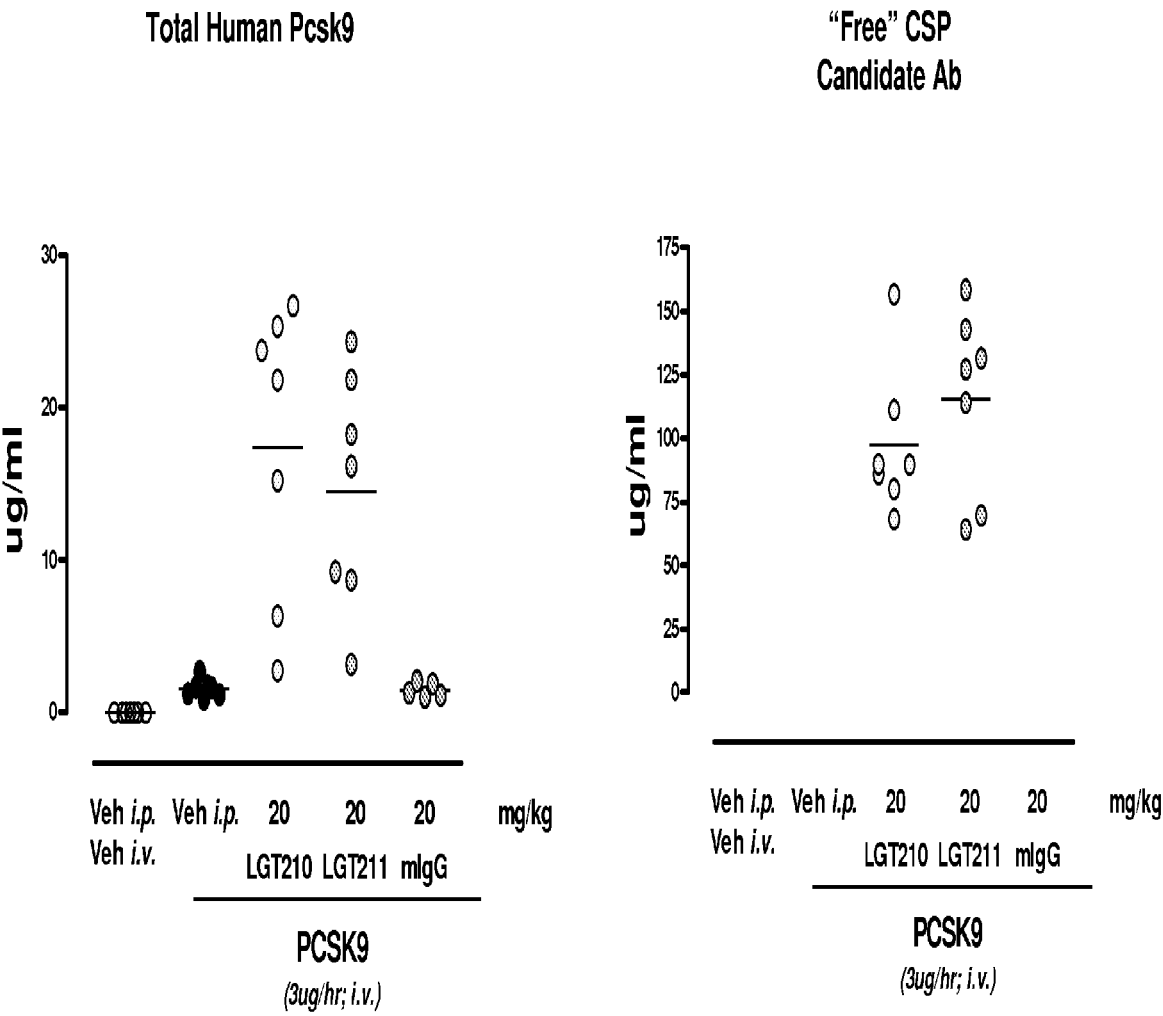
Figure 10



Groups	Number of Mice
PBS (<i>i.p.</i>) + PBS (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	7
PBS (<i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h; <i>i.v.</i>)	7
mlgG (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h; <i>i.v.</i>)	5
LGT209 (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	7
LGT210 (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	5
LGT211 (20 mpk <i>i.p.</i>) + hPcsk9 (3 μ g/h <i>i.v.</i>)	7

15/18

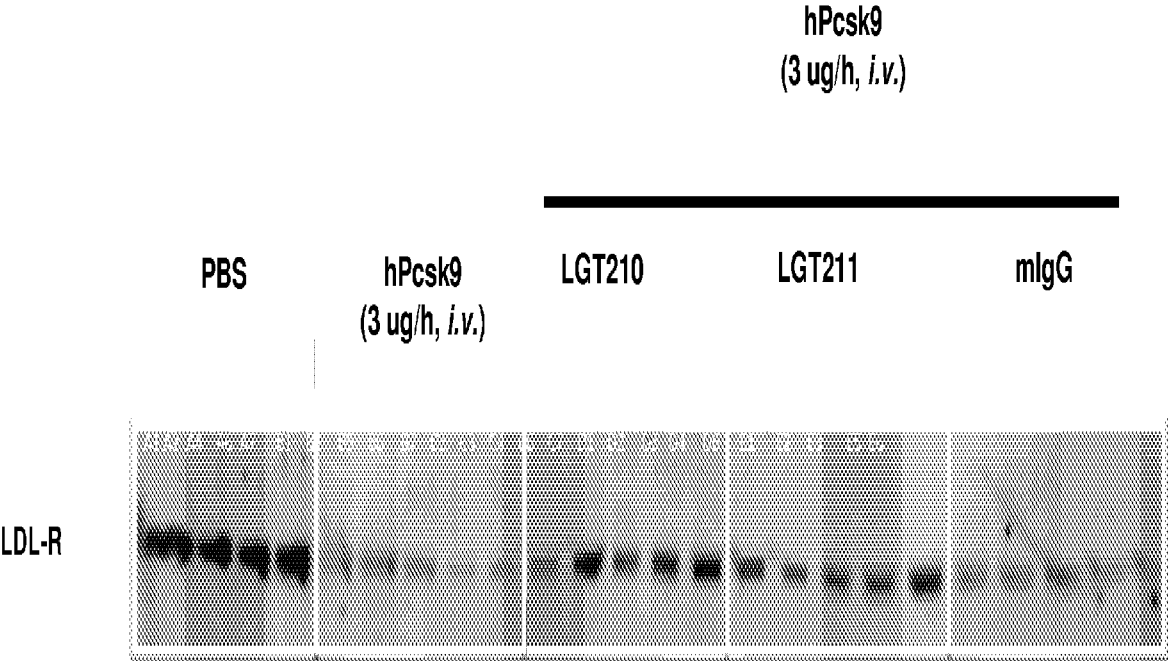
Figure 11



16/18

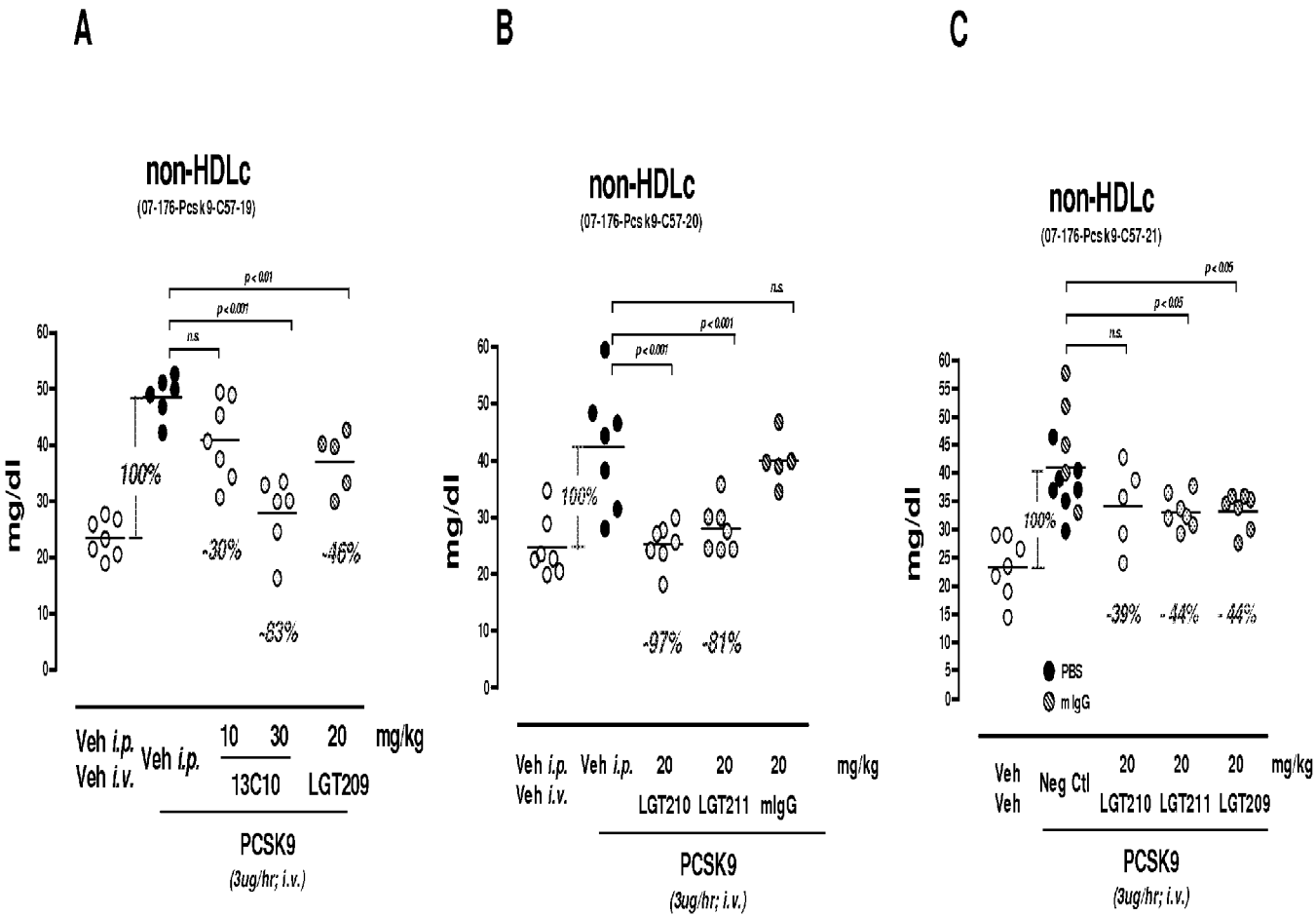
Figure 12

LDL-R Western Blot of Liver Membrane Preparations



17/18

Figure 13

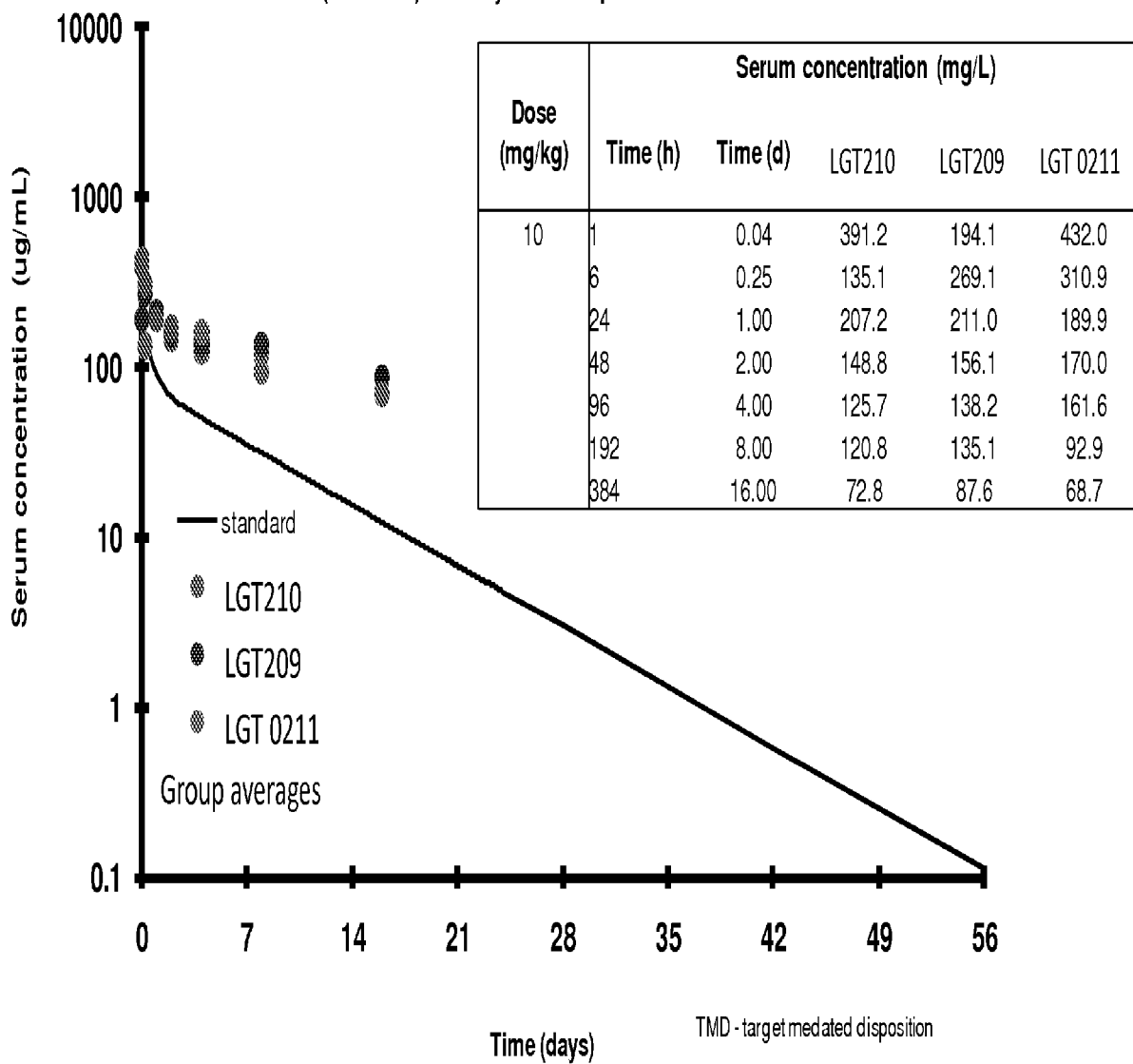


Antibody	non-HDL-C A	non-HDL-C B	non-HDL-C C
LGT209	- 46% ($p < 0.01$)	-	- 44% ($p < 0.05$)
LGT210	-	- 97% ($p < 0.001$)	- 39% (n.s.)
LGT211	-	- 81% ($p < 0.001$)	- 44% ($p < 0.05$)

18/18

Figure 14

PK profile of "typical" IgG mAb in Rats with
non-TMD (solid line) - overlayed with experimental data



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/059959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/40 A61K39/395 A61P3/06
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 A61P

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, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NI YAN G ET AL: "A PCSK9 C-terminal Domain Binding Fab Inhibits PCSK9 Internalization and Restores LDL-uptake", CIRCULATION, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 120, no. 18, Suppl. 2, 1 November 2009 (2009-11-01), page S477, XP008121212, ISSN: 0009-7322	1-33
Y	the whole document	34-50
X	WO 2008/057459 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15)	1-33
Y	page 3, lines 23-28; figures 3A, 3B; examples; table 3	34-50
	----- -/--	



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

28 January 2011

Date of mailing of the international search report

10/02/2011

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

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/059959

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/026558 A1 (AMGEN INC [US]; JACKSON SIMON MARK [US]; WALKER NIGEL PELHAM CLINTON []) 26 February 2009 (2009-02-26) figures 8, 10-12, 14, 28D; examples 1-7, 9, 11-17, 19-21, 24-26; table 7.1 -----	1-50
Y	WO 2009/100297 A1 (MERCK & CO INC [US]; ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CONDRA JON H) 13 August 2009 (2009-08-13) figures 5, 15; examples 1-14 -----	1-50
Y	LI HAI ET AL: "Recent patents on PCSK9: a new target for treating hypercholesterolemia.", RECENT PATENTS ON DNA & GENE SEQUENCES NOV 2009 LNKD- PUBMED:19601924, vol. 3, no. 3, November 2009 (2009-11), pages 201-212, XP002619049, ISSN: 1872-2156 -----	34-50
A	whole document, especially page 205, paragraph 2 -----	1-33
X,P	NI YAN G ET AL: "A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 23 APR 2010 LNKD- PUBMED:20172854, vol. 285, no. 17, 23 April 2010 (2010-04-23), pages 12882-12891, XP002619048, ISSN: 1083-351X -----	1-33
Y,P	the whole document -----	34-50
X,P	WO 2010/068526 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; NI YAN [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT SHI) 17 June 2010 (2010-06-17) page 4, lines 22-23; examples -----	1-33
A	DUFF CHRISTOPHER J ET AL: "Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor.", THE BIOCHEMICAL JOURNAL 1 MAY 2009 LNKD- PUBMED:19196236, vol. 419, no. 3, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 577-584, XP002619050, ISSN: 1470-8728 -----	1-28
	whole document, especially page 578, paragraph 2; Figures 2 and 4 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/059959

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008057459	A2	15-05-2008	
		AU 2007322265 A1	29-05-2008
		CA 2667894 A1	15-05-2008
		CA 2669424 A1	29-05-2008
		EP 2083861 A2	05-08-2009
		EP 2083864 A2	05-08-2009
		JP 2010508817 T	25-03-2010
		US 2010136028 A1	03-06-2010
		US 2010041102 A1	18-02-2010
		WO 2008063382 A2	29-05-2008

WO 2009026558	A1	26-02-2009	
		AR 068011 A1	28-10-2009
		AU 2008288791 A1	26-02-2009
		CA 2696252 A1	26-02-2009
		CN 101932607 A	29-12-2010
		CO 6230997 A2	20-12-2010
		CR 11328 A	12-07-2010
		EA 201000356 A1	30-08-2010
		EP 2215124 A1	11-08-2010
		JP 2010536384 T	02-12-2010
		KR 20100057070 A	28-05-2010
		PE 10062009 A1	14-08-2009
		US 2009142352 A1	04-06-2009
		US 2009326202 A1	31-12-2009

WO 2009100297	A1	13-08-2009	
		AR 070316 A1	31-03-2010
		AU 2009212262 A1	13-08-2009
		CA 2711794 A1	13-08-2009
		EP 2245071 A1	03-11-2010
		PA 8815301 A1	17-09-2009
		US 2009246192 A1	01-10-2009

WO 2010068526	A1	17-06-2010	NONE

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application IRM LLC is entitled to claim priority of earlier application No. 61/285,942 by virtue of the following:
VIII-3-1(i)		IRM LLC is entitled as employer of the inventor, RUE, Sarah
VIII-3-1(i)		IRM LLC is entitled as employer of the inventor, COHEN, Steven B.
VIII-3-1(i)		IRM LLC is entitled as employer of the inventor, LI, Jun

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application NOVARTIS AG is entitled to claim priority of earlier application No. 61/285,942 by virtue of the following:
VIII-3-2(i)		NOVARTIS AG is entitled as employer of the inventor, YOWE, David

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application IRM LLC is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i) i)		IRM LLC is entitled as employer of the inventor, RUE, Sarah
VIII-2-1(i) i)		IRM LLC is entitled as employer of the inventor, COHEN, Steven B.
VIII-2-1(i) i)		IRM LLC is entitled as employer of the inventor, LI, Jun

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application NOVARTIS AG is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i)		NOVARTIS AG is entitled as employer of the inventor, YOWE, David

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (TCP)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
16 de junio de 2011 (16.06.2011)

(10) Número de Publicación Internacional
PCT WO 2011/072263 A1

(51) Clasificación Internacional de Patente:
C07K 16/40 (2006.01) A61P 3/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/US2010/059959

(22) Fecha de Presentación Internacional:
10 de diciembre de 2010 (10.12.2010)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad
61/285,942 11-diciembre-2009 (11.12.2009) US

(71) Solicitante (para todos los Estados (Países) designados excepto US): **IRM LLC** [US/]; 131 Front Street, Hamilton, HM LX (BM). **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea (CH).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **RUE, Sarah** [US/US]; 4028 Carmel Springs Way, San Diego, California 92130 (US). **COHEN, Steven, B.** [US/US]; 4104 Via Candidiz #89, San Diego, California 92130 (US). **LI, Jun** [CN/US]; 11618 Trailbrush Point, San Diego, California 92126 (US). **YOWE, David** [US/US]; 34 Fairview Avenue, Belmont, Massachusetts 02478 (US).

(74) Agente: **SMITH, Timothy, L.** y colaboradores; Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, California 92121 (US).

(81) Estados (Países) Designados (a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): 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, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados (Países) Designados (a menos que se indique de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiáticos (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeos (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones de acuerdo con la Regla 4.17:

- con respecto al derecho de la solicitante de solicitar y otorgársele una patente (Regla 4.17(ii))
- con respecto al derecho de la solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte del listado de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Título : **ANTAGONISTAS DE PCSK9**

(57) Resumen: La presente invención proporciona antagonistas de anticuerpos contra la pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9a ("PCSK9"), y métodos para utilizar estos anticuerpos.

WO 2011/072263 A1

ANTAGONISTAS DE PCSK9

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente invención reivindica el beneficio de prioridad para
5 la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos de
Norteamérica Número 61/285,942, presentada el 11 de diciembre de
2009, la cual es incorporada como referencia para todos los
propósitos.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a antagonistas de anticuerpos
contra PCSK9.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) previene
la aterosclerosis y la hipercolesterolemia a través de la eliminación
15 de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la corriente
sanguínea. El LDL-R se regula al nivel posterior a la traducción
mediante la pro-proteína de convertasa-subtilisina / quexina tipo 9a
("PCSK9"). Recientemente, se reportó la eliminación genética de
PCSK9 en los ratones. Estos ratones mostraron una reducción
20 aproximada del 50 por ciento en los niveles de colesterol en plasma,
y mostraron una mejor sensibilidad a las estatinas para reducir el
colesterol en plasma (Rashid S y colaboradores (2005) *Proc Natl
Acad Sci* 102: 5374-5379. Los datos genéticos humanos también
apoyan el papel de la PCSK9 en la homeostasia de LDL.
25 Recientemente se identificaron dos mutaciones que son

presumiblemente mutaciones de “pérdida de función” en la PCSK9. Los individuos con estas mutaciones tienen una reducción de aproximadamente el 40 por ciento en los niveles en plasma de LDL-C, lo cual se traduce a una disminución aproximada del 50 al 90 por ciento en la enfermedad cardíaca coronaria. Tomados juntos, estos estudios indican que un inhibidor de PCSK9 sería benéfico para reducir las concentraciones en plasma de LDL-C y otras condiciones de enfermedad mediadas por la PCSK9 y se podría co-administrar, por ejemplo, con un segundo agente útil para reducir el colesterol, para tener mayor eficacia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona anticuerpos que se enlazan a, y antagonizan, la función de la pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9) (por ejemplo, SEQ ID NO: 47), y métodos para utilizar estos anticuerpos, por ejemplo, para tratar las condiciones de enfermedad mediadas por PCSK9.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos y moléculas de enlace de antígeno que se enlazan a la pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9). En algunas modalidades, el anticuerpo:

- a) no bloquea el enlace de PCSK9 al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), y
- b) inhibe la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) mediada por PCSK9.

En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace

de antígeno se enlaza a cuando menos un aminoácido dentro de las posiciones de los residuos 680-692 de la PCSK9 humana. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace de antígeno se enlaza a un epítipo de PCSK9 dentro de la
5 secuencia de aminoácidos RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO: 49).

En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace de antígeno se enlaza a la PCSK9 humana con una constante de disociación en equilibrio (KD) de aproximadamente 500 pM o menos. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de
10 enlace de antígeno se enlaza a la PCSK9 humana con una constante de disociación en equilibrio (KD) de aproximadamente 400 pM, 300 pM, 250 pM, 200 pM, 190 pM, 180 pM, 170 pM, 160 pM, 150 pM, 140 pM, o menos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace
15 de antígeno tiene una vida media *in vivo* de cuando menos aproximadamente 7 días. En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace de antígeno tiene una vida media *in vivo* de cuando menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días. En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace de
20 antígeno tiene un efecto reductor del colesterol *in vivo* de cuando menos aproximadamente 2 semanas, por ejemplo, 2, 3, 4 semanas o más tiempo. De preferencia, la vida media *in vivo* se determina en un sujeto humano.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende:

25 (a) una región variable de cadena pesada que comprende un

segmento-V de cadena pesada humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende un
5 segmento-V de cadena ligera humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera, en donde:

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de
10 aminoácidos SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO: 14); y

ii) la región variable de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO: 26).

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende:

15 (a) una región variable de cadena pesada que comprende un segmento-V de cadena pesada humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende un
20 segmento-V de cadena ligera humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera, en donde:

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de
25 aminoácidos SYYYYNMDY (SEQ ID NO: 12); y

ii) la región variable de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO: 26).

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende:

5 (a) una región variable de cadena pesada que comprende un segmento-V de cadena pesada humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende un
10 segmento-V de cadena ligera humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera, en donde:

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de
15 aminoácidos SYYYAMDY (SEQ ID NO: 13); y

ii) la región variable de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO: 26).

En algunas modalidades, la región determinante de
20 complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; y la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

25 En algunas modalidades, el segmento-V de la cadena pesada

tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28, y en donde el segmento-V de la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

En algunas modalidades, el segmento-V de la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27, y en donde el segmento-V de la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.

En algunas modalidades, la región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada es una región de estructura 4 (FR4) de la línea germinal humana. En algunas modalidades, la región de estructura 4

(FR4) de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 35.

En algunas modalidades, la región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera es una región de estructura 4 (FR4) de la línea germinal humana. En algunas modalidades, la región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 39.

En algunas modalidades, el segmento-V de la cadena pesada y el segmento-V de la cadena ligera, cada uno comprenden una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), y una región determinante de complementariedad 2 (CDR2); en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;

iii) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y

iv) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, el segmento-V de la cadena pesada y el segmento-V de la cadena ligera, cada uno comprenden una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), y una región determinante de complementariedad 2 (CDR2); en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

5 ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y

10 iv) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades,

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) 15 del segmento-V de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 7;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos 20 seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 21;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) 25 del segmento-V de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 24; y

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por
5 ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la SEQ ID NO: 40, y la región variable de cadena ligera tiene cuando menos el 90 por ciento
10 de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la SEQ ID NO: 41.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 40, y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 41.

15 En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por
20 ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 y la región variable de cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 88 por
ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por
ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por
25 ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de

identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18.

5 En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG. En algunas modalidades, el anticuerpo es una IgG1. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una cadena pesada que comparte cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una cadena ligera que comparte cuando menos el 85 por ciento, el 88 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17 y 25 SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un fragmento Fab'. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo de una sola cadena (scFv). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende regiones constantes humanas. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región constante de IgG1 humana se muta para tener una afinidad de enlace reducida por un ligando efector, tal como el receptor de Fc (FcR), por ejemplo, Fc gamma R1, sobre una célula o el componente de complemento C1. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,624,821. En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos L234 y L235 de la región constante de IgG1 están sustituidos por Ala234 y Ala235. La numeración de los residuos en la región constante de cadena pesada es aquélla del índice de la Unión Europea (EU) (véase, Kabat y colaboradores (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Dept. Health and Human Services (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos).

En algunas modalidades, el anticuerpo está enlazado a una proteína portadora, por ejemplo, albúmina.

En algunas modalidades, el anticuerpo está PEGilado.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se enlazan a PCSK9, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena

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

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1)
5 de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;

10 iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de
15 aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3)
20 de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades,

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de
25 aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID

NO: 6 y SEQ ID NO: 7;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID
5 NO: 9 y SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID
NO: 12 y SEQ ID NO: 13;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID
10 NO: 20 y SEQ ID NO: 21;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID
15 NO: 23 y SEQ ID NO: 24;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.
20

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se enlazan a PCSK9, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, cada una comprenden
25

las siguientes tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs): CDR1, CDR2 y CDR3; en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se enlazan a PCSK9, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, cada una comprenden

las siguientes tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs): CDR1, CDR2 y CDR3; en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona anticuerpos que se enlazan a PCSK9, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, cada una comprenden

las siguientes tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs): CDR1, CDR2 y CDR3; en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo o la molécula de enlace de antígeno como se describe en la presente, y un excipiente fisiológicamente compatible.

En algunas modalidades, la composición comprende además un

segundo agente que reduce los niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en un individuo.

En algunas modalidades, el segundo agente es una estatina. Por ejemplo, la estatina se puede seleccionar a partir del grupo que
5 consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y simvastatina.

En algunas modalidades, el segundo agente se selecciona a partir del grupo que consiste en fibratos, niacina y análogos de la
10 misma, un inhibidor de la absorción de colesterol, un secuestrante de ácido biliar, un mimético de hormona tiroides, un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos microsomal, un inhibidor de acil-transferasa de diacil-glicerol (DGAT), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la
15 apoB100.

En un aspecto adicional, la invención proporciona métodos para reducir el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C), el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C), y/o el colesterol total en un individuo que lo necesite, comprendiendo
20 el método administrar una cantidad terapéuticamente efectiva al individuo, de un anticuerpo o de la molécula de enlace de antígeno como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el individuo tiene hipo-respuesta o es resistente a la terapia con estatina. En algunas modalidades, el
25 individuo es intolerante a la terapia con estatina. En algunas

modalidades, el individuo tiene un nivel de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) de la línea base de cuando menos aproximadamente 100 miligramos/decilitro, por ejemplo, de cuando menos aproximadamente 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 miligramos/decilitro, o más alto. En algunas modalidades, el individuo tiene hipercolesterolemia familiar. En algunas modalidades, el individuo tiene trigliceridemia. En algunas modalidades, el individuo tiene una mutación del gen de PCSK9 de ganancia de función. En algunas modalidades, el individuo tiene dislipidemia inducida por fármacos.

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

En algunas modalidades, los métodos comprenden además administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente efectivo para reducir el LDL-C al individuo.

En algunas modalidades, el segundo agente es una estatina. Por ejemplo, la estatina se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y simvastatina.

En algunas modalidades, el segundo agente se selecciona a partir del grupo que consiste en fibratos, niacina y análogos de la misma, inhibidores de la absorción de colesterol, secuestrantes de ácido biliar, miméticos de hormona tiroides, un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos microsomal, un inhibidor de acil-

transferasa de diacil-glicerol (DGAT), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la apoB100.

En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace
5 de antígeno y el segundo agente se co-administran como una mezcla.

En algunas modalidades, el anticuerpo o la molécula de enlace de antígeno y el segundo agente se co-administran por separado.

En algunas modalidades, el anticuerpo se administra
10 intravenosamente. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra subcutáneamente.

DEFINICIONES

Un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido de la familia de inmunoglobulina, o un polipéptido que comprende fragmentos de una
15 inmunoglobulina que es capaz de enlazarse no covalentemente, reversiblemente, y de una manera específica al antígeno correspondiente. Una unidad estructural de anticuerpo de ejemplo comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena
20 "ligera" (de aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50 a 70 kD), conectadas a través de un enlace de disulfuro. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante κ , λ , α , γ , δ , ϵ , y μ , así como la gran cantidad de genes de región variable de inmunoglobulina. Las
25 cadenas ligeras se clasifican como ya sea κ o bien λ . Las cadenas

pesadas se clasifican como γ , μ , α , δ , ó ϵ , las cuales definen a su vez las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente. El término N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos primordialmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos "cadena ligera variable" (V_L) y "cadena pesada variable" (V_H), se refieren a estas regiones de las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Como se utiliza en esta solicitud, un "anticuerpo" abarca todas las variaciones de anticuerpos y fragmentos de los mismos que posean específicamente un enlace particular, por ejemplo, para PCSK9. Por consiguiente, dentro del alcance de este concepto están los anticuerpos de longitud completa, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos de una sola cadena (scFv), Fab, Fab', y las versiones multiméricas de estos fragmentos (por ejemplo, $F(ab')_2$) con la misma especificidad de enlace.

"Dominios determinantes de complementariedad" o "regiones determinantes de complementariedad" ("CDRs") se refieren de una manera intercambiable a las regiones hipervariables de V_L y V_H . Las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) son el sitio de enlace de proteína objetivo de las cadenas de anticuerpo, que aloja la especificidad para esa proteína objetivo. Hay tres CDRs (CDR1-3, numeradas en secuencia a partir del término N) en cada V_L o V_H humana, que constituyen de aproximadamente el 15 al 20 por ciento de los dominios variables. Las regiones determinantes de

complementariedad (CDRs) son estructuralmente complementarias para el epítipo de la proteína objetivo y, por consiguiente, son directamente responsables de la especificidad de enlace. Los estiramientos restantes de V_L o V_H , las denominadas como regiones de estructura, exhiben menos variación en la secuencia de aminoácidos (Kuby, Immunology, 4^a Edición, Capítulo 4. W. H. Freeman & Co., Nueva York, 2000).

Las posiciones de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) y de las regiones de estructura, se determinan utilizando diferentes definiciones bien conocidas en este campo, por ejemplo, Kabat, Chotia, la base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) (en la red mundial en imgt.cines.fr/), y AbM (véase, por ejemplo, Johnson y colaboradores, *Ácido nucleicos Res.*, 29: 205-206 (2001); Chotia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987); Chotia y colaboradores, *Nature*, 342: 877-883 (1989); Chotia y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 227: 799-817 (1992); Al-Lazikani y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-748 (1997)). Las definiciones de los sitios de combinación de antígenos también se describen en los siguientes: Ruiz y colaboradores, *Ácido nucleicos Res.*, 28: 219–221 (2000); y Lefranc, M. P., *Ácido nucleicos Res.*, 29: 207-209 (2001); MacCallum y colaboradores, *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996); y Martin y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 86: 9268–9272 (1989); Martin y colaboradores, *Methods Enzymol.*, 203: 121–153 (1991); y Rees y colaboradores, en Sternberg M.J.E. (Editor), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press,

Oxford, 141–172 (1996).

El término “determinante de especificidad de enlace” o “BSD”, se refiere de una manera intercambiable a la secuencia de aminoácidos mínima contigua o no contigua dentro de una región determinante de complementariedad, necesaria para determinar la especificidad de enlace de un anticuerpo. Un determinante de especificidad de enlace mínima puede estar dentro de una o más secuencias CDR. En algunas modalidades, los determinantes de especificidad de enlace mínima residen dentro de (es decir, son determinados exclusivamente por) una porción o la longitud completa de las secuencias CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

Una “cadena ligera de anticuerpo” o una “cadena pesada de anticuerpo”, como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende la V_L o la V_H , respectivamente. La V_L endógena es codificada por los segmentos V del gen (variables) y J (de unión), y la V_H endógena, por V, D (diversidad), y J. Cada una de V_L o V_H incluye las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) así como las regiones de estructura. En esta solicitud, las cadenas ligeras de anticuerpos y/o las cadenas pesadas de anticuerpos, de cuando en cuando, pueden ser colectivamente referidas como “cadenas de anticuerpos”. Estos términos abarcan las cadenas de anticuerpos que contengan mutaciones que no alteren la estructura básica de V_L o V_H , como lo reconocerá fácilmente un experto en la materia.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diferentes peptidasas. Por consiguiente, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces de disulfuro, en la región de articulación, para producir el $F(ab)'_2$, un dímero de Fab' que por sí mismo es una cadena ligera unida a V_H - C_H1 por un enlace de disulfuro. El $F(ab)'_2$ se puede reducirse bajo condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región de articulación, convirtiendo de esta manera el dímero de $F(ab)'_2$ en un monómero de Fab'. El monómero de Fab' es esencialmente Fab con una parte de la región de articulación. Paul, *Fundamental Immunology* 3^a Edición (1993). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que estos fragmentos se pueden sintetizar *de novo* ya sea químicamente, o bien empleando la metodología de ADN recombinante. Por consiguiente, el término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, también incluye fragmentos de anticuerpos ya sea producidos mediante la modificación de los anticuerpos enteros, o bien aquéllos sintetizados *de novo* empleando las metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, el Fv de una sola cadena), o aquéllos identificados utilizando bibliotecas de exhibición de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty y colaboradores, *Nature* 348: 552-554 (1990)).

Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, se puede emplear cualquier técnica conocida en la

materia (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor y colaboradores, *Immunology Today* 4:72 (1983); Cole y colaboradores, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, páginas 77-96. Alan R. Liss, Inc. 1985). Las técnicas para la
5 producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,946,778) se puede adaptar para producir anticuerpos para los polipéptidos de esta invención. También, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, tales como otros mamíferos, para expresar los
10 anticuerpos humanizados. De una manera alternativa, se puede emplear la tecnología de exhibición de fagos para identificar los anticuerpos y los fragmentos Fab heteroméricos que se enlacen específicamente con antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty y colaboradores, *supra*; Marks y colaboradores,
15 *Biotechnology*, 10: 779-783, (1992)).

Los métodos para la humanización o la primatización de anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. En términos generales, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una
20 fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos con referidos con frecuencia como residuos de importación, los cuales típicamente se toman a partir de un dominio variable de importación. La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo,
25 Jones y colaboradores, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann y

colaboradores, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y colaboradores, *Science* 239:1534-1536 (1988), y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)), mediante la introducción de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de roedor, o de las secuencias de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de roedor, para sustituir las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De conformidad con lo anterior, estos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,816,567), en donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente a partir de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en donde algunos residuos de la región determinante de complementariedad ("CDR") y posiblemente algunos residuos de la región de estructura ("FR") son sustituidos por residuos a partir de los sitios análogos de los anticuerpos de roedor.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en donde: (a) la región constante, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada, o intercambiada, de tal manera que el sitio de enlace de antígeno (región variable) se enlaza a una región constante de una clase, función efectora, y/o especie diferente o alterada, o a una molécula enteramente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, y fármaco; o (b) la

región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada, o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

Los anticuerpos o moléculas de enlace de antígeno de la invención incluyen además una o más cadenas de inmunoglobulina que se conjugan químicamente con, o se expresan como, proteínas de fusión con otras proteínas. También incluyen al anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesada/ligera diferentes y dos sitios de enlace diferentes. Otros fragmentos o porciones de anticuerpos de enlace de antígeno de la invención incluyen al scFv bivalente (diacuerpo), los anticuerpos scFv biespecíficos en donde la molécula de anticuerpo reconoce dos epítomos diferentes, dominios de enlace individuales (dAbs), y minicuerpos.

Los diversos anticuerpos o fragmentos de enlace de antígeno descritos en la presente se pueden producir mediante la modificación enzimática o química de los anticuerpos intactos, o se pueden sintetizar *de novo* empleando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de una sola cadena), o se pueden identificar utilizando bibliotecas de exhibición de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty y colaboradores, Nature 348: 552-554, 1990). Por ejemplo, los minicuerpos se pueden generar empleando los métodos descritos en este campo, por ejemplo, Vaughan y Sollazzo, Comb Chem High Throughput Screen. 4: 417-30 2001. Los anticuerpos

biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos, incluyendo fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny y colaboradores, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992). Los anticuerpos de una sola cadena se pueden identificar
5 utilizando bibliotecas de exhibición de fagos o bibliotecas de exhibición de ribosoma, o bibliotecas de genes mezclados. Estas bibliotecas se pueden construir a partir de fuentes sintéticas, semi-sintéticas, o nativas e inmunocompetentes.

10 Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en donde: (a) la región constante, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada, de tal manera que el sitio de enlace de antígeno (región variable) se enlaza a una región constante de una clase, función efectora, y/o especie diferente o
15 alterada, o a una molécula enteramente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada, con una región variable que tiene una
20 especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos más adelante, un anticuerpo anti-PCSK9 de ratón se puede modificar mediante el reemplazo de su región constante con la región constante a partir de una inmunoglobulina humana. Debido al reemplazo con una región constante humana, el
25 anticuerpo quimérico puede retener su especificidad para reconocer

la PCSK9 humana, mientras que tiene una antigenicidad reducida en el ser humano comparándose con el anticuerpo de ratón original.

El término “molécula de enlace de anticuerpo” o “ligando que no es anticuerpo” se refiere a miméticos de anticuerpos que utilizan andamiajes de proteína que no es inmunoglobulina, incluyendo
5 adnectinas, avímeros, moléculas de enlace de polipéptido de una sola cadena, y peptidomiméticos de enlace tipo anticuerpos.

El término “región variable” o “región-V” se refiere, de una manera intercambiable, a una cadena pesada o ligera que
10 comprende FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Véase la Figura 1. Una región variable endógena es codificada por los genes V-D-J de cadena pesada o por los genes V-J de cadena ligera de inmunoglobulina. Una región-V puede ser de presentación natural, recombinante, o sintética.

15 Como se utiliza en la presente, el término “segmento variable” o “segmento-V” se refiere, de una manera intercambiable, a una subsecuencia de la región variable que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3. Véase la Figura 1. Un segmento-V endógeno es codificado por un gen-V de inmunoglobulina. Un segmento-V puede
20 ser de presentación natural, recombinante, o sintético.

Como se utiliza en la presente, el término “segmento-J” se refiere a una subsecuencia de la región variable codificada que comprende una porción C-terminal de una CDR3 y la FR4. Un
segmento-J endógeno es codificado por un gen-J de
25 inmunoglobulina. Véase la Figura 1. Un segmento-J puede ser de

presentación natural, recombinante, o sintético.

Un anticuerpo “humanizado” es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano, mientras que es menos inmunogénico en los seres humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la conservación de las regiones CDR no humanas, y el reemplazo de las partes restantes del anticuerpo con sus contrapartes humanas. Véase, por ejemplo, Morrison y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 81: 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44: 65-92 (1988); Verhoeyen y colaboradores, *Science*, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28: 489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3): 169-217 (1994).

El término “secuencia de la línea germinal humana correspondiente” se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana que comparte la más alta identidad de secuencia de aminoácidos determinada, con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable de referencia, en comparación con todas las otras secuencias de aminoácidos de región variable conocidas codificadas por las secuencias de región variable de inmunoglobulina de la línea germinal humana. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente también puede referirse a la secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana con la más alta identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable

de referencia, en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de la región variable. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente puede ser de las regiones de estructura solamente, de las regiones determinantes de complementariedad solamente, de las regiones de estructura y determinantes de complementariedad, un segmento variable (como se define anteriormente), u otras combinaciones de secuencias o subsecuencias que comprendan una región variable. La identidad de secuencia se puede determinar empleando los métodos descritos en la presente, por ejemplo, mediante la alineación de dos secuencias utilizando BLAST, ALIGN, u otro algoritmo de alineación conocido en la materia. La secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de la línea germinal humana correspondiente puede tener una identidad de secuencia de cuando menos aproximadamente el 90 por ciento, el 92 por ciento, el 94 por ciento, el 96 por ciento, el 98 por ciento, o el 99 por ciento con la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de la región variable de referencia. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente se puede determinar, por ejemplo, por medio de la base de datos internacional ImMunoGeneTics públicamente disponible (IMGT) (en la red mundial, en imgt.cines.fr/), y en V-base (en la red mundial, en vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

La frase “se enlazan específicamente (o selectivamente)”, cuando se utilizan en el contexto de describir la interacción entre un antígeno, por ejemplo, una proteína, con un anticuerpo o con un agente de enlace derivado de un anticuerpo, se refiere a una

reacción de enlace que es determinante de la presencia del antígeno en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos, por ejemplo, en una muestra biológica, por ejemplo, en una muestra de sangre, suero, plasma, o tejido. Por consiguiente, 5 bajo las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o los agentes de enlace con una especificidad de enlace particular se enlazan a un antígeno particular cuando menos dos veces el fondo, y no se enlazan sustancialmente en una cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. El enlace específico a un 10 anticuerpo o a un agente de enlace bajo estas condiciones puede requerir que el anticuerpo o el agente se haya seleccionado por su especificidad para una proteína particular. Como sea deseado o apropiado, esta selección se puede lograr sustrayendo los anticuerpos que reaccionen cruzadamente, por ejemplo, con las 15 moléculas de PCSK9 a partir de otras especies (por ejemplo, de ratón), o con otros subtipos de PCSK. Se pueden emplear una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmuno-reactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase 20 sólida para seleccionar los anticuerpos específicamente inmuno-reactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos que se pueden emplear para determinar la inmuno-reactividad específica). 25 Típicamente, una reacción de enlace específica o selectiva producirá

una señal cuando menos dos veces sobre la señal del fondo, y más típicamente cuando menos de 10 a 100 veces sobre el fondo.

El término “constante de disociación en equilibrio (K_D , M)” se refiere a la constante del índice de disociación (k_d , tiempo⁻¹) dividida entre la constante del índice de asociación (k_a , tiempo⁻¹, M⁻¹). Las
5 constantes de disociación en equilibrio se pueden medir empleando cualquier método conocido en este campo. Los anticuerpos de la presente invención tendrán, en términos generales, una constante de disociación en equilibrio de menos de aproximadamente 10^{-7} ó
10 10^{-8} M, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10^{-9} M ó 10^{-10} M, en algunas modalidades, de menos de aproximadamente 10^{-11} M, 10^{-12} M ó 10^{-13} M.

Como se utiliza en la presente, el término “región de enlace de antígeno” se refiere a un dominio de la molécula de enlace de
15 PCSK9 de esta invención que es responsable del enlace específico entre la molécula y PCSK9. Una región de enlace de antígeno incluye cuando menos una región variable de cadena pesada de un anticuerpo y cuando menos una región variable de cadena ligera de un anticuerpo. Existe cuando menos una de estas regiones de enlace
20 de antígeno presente en cada molécula de enlace de PCSK9 de esta invención, y cada una de las regiones de enlace de antígeno puede ser idéntica o diferente de las otras. En algunas modalidades, cuando menos una de las regiones de enlace de antígeno de una molécula de enlace de PCSK9 de esta invención, actúa como un
25 antagonista de PCSK9.

El término “antagonista”, como se utiliza en la presente, se refiere a un agente que es capaz de enlazarse e inhibir específicamente la actividad de la molécula objetivo. Por ejemplo, un antagonista de PCSK9 se enlaza específicamente a PCSK9 e inhibe total o parcialmente la degradación del LDL-R mediada por PCSK9. La inhibición de la degradación del LDL-R mediada por PCSK9 puede o no interferir con el enlace de PCSK9 al LDL-R. En algunos casos, un antagonista de PCSK9 se puede identificar por su capacidad para enlazarse a PCSK9 e inhibir el enlace de PCSK9 al LDL-R. La inhibición se presenta cuando la degradación del LDL-R mediada por PCSK9, cuando se expone a un antagonista de la invención, es cuando menos aproximadamente el 10 por ciento menor, por ejemplo, cuando menos aproximadamente el 25 por ciento, el 50 por ciento, el 75 por ciento menor, o es totalmente inhibida, en comparación con la degradación mediada por PCSK9 en la presencia de un control o en ausencia del antagonista. Un control puede no exponerse a ningún anticuerpo o molécula de enlace de antígeno, o se puede exponer a un anticuerpo o molécula de enlace de antígeno que se enlace específicamente a otro antígeno, o a un anticuerpo anti-PCSK9 o molécula de enlace de antígeno que se sepa que no funciona como un antagonista. Un “antagonista de anticuerpo” se refiere a la situación en donde el antagonista es un anticuerpo inhibidor.

El término “PCSK9” o “pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9a” se refieren de una manera intercambiable

a una pro-proteína convertasa humana que se presenta naturalmente perteneciente a la sub-familia de proteinasa K de la familia de subtilasa secretora. La PCSK9 se sintetiza como un zimógeno soluble que experimenta un procesamiento intramolecular autocatalítico en el retículo endoplásmico, y se piensa que funciona como una pro-proteína convertasa. La PCSK9 tiene una función en la homeostasia del colesterol y puede tener una función en la diferenciación de las neuronas corticales. Las mutaciones en este gen de PCSK9 se han asociado con una forma de hipercolesterolemia familiar dominante autosomal. Véase, por ejemplo, Burnett y Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1): 11-26. El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de PCSK9 son conocidos, y se han publicado en GenBank Números de Acceso NM_174936.2 y NP_777596.2, respectivamente. Como se utiliza en la presente, un polipéptido de PCSK9 se enlaza funcionalmente al LDL-R y promueve la degradación del LDL-R. Estructuralmente, una secuencia de aminoácidos de PCSK9 tiene cuando menos aproximadamente el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento ó el 100 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de GenBank Número de Acceso NP_777596.2. Estructuralmente, una secuencia de ácido nucleico de PCSK9 tiene cuando menos aproximadamente el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento,

el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento ó el 100 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de GenBank Número de Acceso NM_174936.2.

La frase “mutación de ganancia de función de PCSK9” se refiere a las mutaciones naturales que se presentan en los genes de PCSK9 que están asociados con y/o son causantes del fenotipo de hipercolesterolemia familiar, aterosclerosis acelerada, y enfermedad cardíaca coronaria prematura, por ejemplo, debido a una mejor degradación del LDL-R y a una reducción de los niveles de LDL-R. La frecuencia del alelo de las mutaciones de ganancia de función de PCSK9 es rara. Véase, Burnett y Hooper, *Clin Biochem Rev.* (2008) 29(1): 11-26. Las mutaciones de ganancia de función de PCSK9 de ejemplo incluyen D129N, D374H, N425S y R496W. Véase, Fasano y colaboradores, *Atherosclerosis* (2009) 203(1): 166-71. Las mutaciones de ganancia de función de PCSK9 se revisan, por ejemplo, en Burnett y Hooper, *supra*; Fasano y colaboradores, *supra*; Abifadel y colaboradores, *J Med Genet* (2008) 45(12): 780-6; Abifadel y colaboradores, *Hum Mutat* (2009) 30(4): 520-9; y Li y colaboradores, *Recent Pat DNA Gene Seq* (2009) Noviembre 1 (PMID 19601924).

“Actividad” de un polipéptido de la invención se refiere a las funciones estructurales, reguladoras, o bioquímicas de un polipéptido en su célula o tejido nativo. Los ejemplos de la actividad de un polipéptido incluyen tanto las actividades directas como las actividades indirectas. Las actividades directas de PCSK9 de

ejemplo son el resultado de la interacción directa con el polipéptido, incluyendo el enlace al LDL-R y la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) mediada por PCSK9. Las actividades indirectas de ejemplo en el contexto de PCSK9 se observan como un cambio en el fenotipo o en la respuesta en una célula, tejido, órgano, o sujeto, a una actividad dirigida por el polipéptido, por ejemplo, la reducción del aumento de LDL-R en el hígado, la reducción del HDL-C en plasma, la disminución del colesterol en plasma, o mejoras en la sensibilidad a las estatinas.

El término “aislado”, cuando se aplica a un ácido nucleico o a una proteína, denota que el ácido nucleico o la proteína están esencialmente libres de otros componentes celulares con los que están asociados en el estado natural. Están de preferencia en un estado homogéneo. Puede estar en una solución ya sea seca o bien acuosa. La pureza y la homogeneidad típicamente se determinan empleando técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, se separa un gen aislado de los marcos de lectura abierta que flanquean al gen y codifican una proteína diferente del gen de interés. El término “purificada” denota que un ácido nucleico o una proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. En particular, significa que el ácido nucleico o la proteína es cuando menos el 85 por ciento pura, más preferiblemente

cuando menos el 95 por ciento pura, y de una manera muy preferible cuando menos el 99 por ciento pura.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN), y los polímeros de los mismos en una forma ya sea de una sola cadena o bien de doble cadena. A menos que se limite de una manera específica, el término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de natural nucleótidos naturales que tienen propiedades de enlace similares a las del ácido nucleico de referencia, y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos que se presentan naturalmente. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente las variantes conservadoramente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), los alelos, ortólogos, SNPs, y las secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. De una manera específica, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr mediante la generación de secuencias en donde la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos), está sustituida con residuos de bases mixtas y/o de desoxi-inosina (Batzner y colaboradores, *Nucleic Acid Res.* **19**: 5081 (1991); Ohtsuka y colaboradores, *J. Biol. Chem.* **260**: 2605-2608 (1985); y Rossolini y colaboradores, *Mol. Cell. Probes* **8**: 91-98 (1994)).

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de

residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido que se presenta naturalmente correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se presentan naturalmente y a los polímeros de aminoácidos que no se presentan naturalmente.

El término “aminoácido” se refiere a los aminoácidos que se presentan naturalmente y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se presentan naturalmente. Los aminoácidos que se presentan naturalmente son aquéllos codificados por el código genético, así como los aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxi-glutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente, es decir, un carbono- α que se enlaza a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metil-sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina), o estructuras base de péptidos modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se presenta naturalmente. Los miméticos de aminoácidos se refieren a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar

a un aminoácido que se presenta naturalmente.

“Variantes conservadoramente modificadas” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos particulares, las

5 variantes conservadoramente modificadas se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta las secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran

10 número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición en donde una alanina sea especificada por un codón, el codón puede ser alterado hasta cualquiera de los codones

15 correspondientes descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", las cuales son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente que codifica un polipéptido, también describe cada variación silenciosa

20 posible del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón de un ácido nucleico (excepto AUG, el cual es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, el cual es ordinariamente el único codón para triptófano) puede ser modificado para proporcionar una molécula funcionalmente idéntica. De conformidad con lo anterior,

25 cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifique un

polipéptido es implícita en cada secuencia descrita.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones, o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína, que alteren, agreguen, o supriman un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada, es una "variante conservadoramente modificada", en donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la materia se conocen bien las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Estas variantes conservadoramente modificadas son en adición a, y no excluyen, las variantes polimórficas, los homólogos inter-especies, y los alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno los aminoácidos que son sustituciones conservadoras unos por otros:

1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

El "porcentaje de identidad de secuencia" se determina mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde la porción de la

secuencia del polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos), comparándose con la secuencia de referencia (por ejemplo, un polipéptido de la invención), la cual no comprende adiciones o supresiones, para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que se presenta la base de ácido nucleico idéntica o el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias, para proporcionar el número de posiciones emparejadas, se divide el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación, y se multiplica el resultado por 100, para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "idéntica" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas secuencias. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si las dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o de nucleótidos que son iguales (es decir, una identidad de secuencia del 70 por ciento, 75 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento, 96 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento o 99 por ciento sobre una región especificada, o, cuando no se especifique, sobre toda la secuencia de una secuencia de referencia), cuando se compara o se alinea para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o sobre una región designada medida

utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineación manual e inspección visual. La invención proporciona polipéptidos o polinucleótidos que son sustancialmente idénticos a los polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente, ejemplificados en la presente (por ejemplo, las regiones variables ejemplificadas en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-5, 15-19, y 40-41; los segmentos variables ejemplificados en cualquiera de las SEQ ID NOs: 27-31; las CDRs ejemplificadas en cualquiera de las SEQ ID NOs: 6-14, 20-26; las FRs ejemplificadas en cualquiera de las SEQ ID NOs: 32-39; y las secuencias de ácidos nucleicos ejemplificadas en cualquiera de las SEQ ID NOs; 42-45). Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que es de cuando menos aproximadamente 15, 25 ó 50 nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 ó 1000 o más nucleótidos de longitud, o sobre la longitud completa de la secuencia de referencia. Con respecto a las secuencias de aminoácidos, puede existir identidad o una identidad sustancial sobre una región que es de cuando menos 5, 10, 15 ó 20 aminoácidos de longitud, opcionalmente de cuando menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 50, 75 ó 100 aminoácidos de longitud, opcionalmente de cuando menos aproximadamente 150, 200 ó 250 aminoácidos de longitud, o sobre la longitud completa de la secuencia de referencia. Con respecto a las secuencias de aminoácidos más cortas, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de 20 ó menos aminoácidos, existe una identidad sustancial cuando

uno o dos residuos de aminoácidos son conservadoramente sustituidos, de acuerdo con las sustituciones conservadoras definidas en la presente.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia
5 actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las
secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de
comparación de secuencias, se introducen en una computadora las
secuencias de prueba y de referencia, se designan las coordenadas
de las subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros
10 del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los
parámetros del programa por omisión, o se pueden designar
parámetros alternativos. Entonces el algoritmo de comparación de
secuencias calcula los porcentajes de identidad de secuencias para
las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia,
15 basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como se utiliza en la presente,
incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de
posiciones contiguas seleccionadas a partir del grupo que consiste
en 20 a 600, usualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente
20 200, más usualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente
150, en donde una secuencia puede compararse con una secuencia
de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de
que se alinean óptimamente las dos secuencias. Los métodos de
alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la
25 materia. La alineación óptima de secuencias para comparación se

puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, mediante el método de
5 búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante
10 alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology* (suplemento de 1995)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de similitud de
15 secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, los cuales se describen en Altschul y colaboradores (1977) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, y Altschul y colaboradores (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for
20 Biotechnology Information. Este algoritmo involucra primero identificar los pares de secuencias de alto puntaje (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de una longitud W en la secuencia pedida, ya sea que se emparejen o satisfagan algún puntaje umbral T de valor positivo cuando sean alineadas con una
25 palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de

datos. T es referido como el umbral de puntaje de palabra vecina (Altschul y colaboradores, *supra*). Estos impactos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas con el fin de encontrar pares de secuencias de alto puntaje (HSPs) más largos que las contengan. Los impactos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda incrementar el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre > 0), y N (puntaje de multa para residuos mal emparejados; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los impactos de palabras en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativo cae fuera por la cantidad X desde su máximo valor alcanzado; el puntaje acumulativo llega hasta cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros W , T , y X del algoritmo BLAST, determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por omisión una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por omisión una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntaje

BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89: 10915) utiliza alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90: 5873-5787). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), la cual proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se presentaría por azar un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña, en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia, es menor de aproximadamente 0.2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01, y de una manera muy preferible menor de aproximadamente 0.001.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos son sustancialmente idénticas, es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo cruzadamente con los anticuerpos reproducidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe más adelante. Por consiguiente, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, en donde los dos péptidos difieren solamente por las sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias

de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan una con la otra bajo condiciones restringentes, como se describe más adelante. Todavía otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, es que se pueden utilizar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

El término “enlazar”, cuando se utiliza en el contexto de describir la manera en que se conectan las regiones de enlace de antígeno dentro de una molécula de enlace de PCSK9 de esta invención, abarca todos los significados posibles para unir físicamente las regiones. La multitud de regiones de enlace de antígeno con frecuencia se unen mediante enlaces químicos, tales como un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico o un enlace de disulfuro) o un enlace no covalente, el cual puede ser ya sea un enlace directo (es decir, sin un enlazador entre dos regiones de enlace de antígeno) o bien un enlace indirecto (es decir, con la ayuda de cuando menos una molécula enlazadora entre dos o más regiones de enlace de antígeno).

Los términos “sujeto”, “paciente”, e “individuo” se refieren de una manera intercambiable a un mamífero, por ejemplo, a un ser humano o a un mamífero primate no humano. El mamífero también puede ser un mamífero de laboratorio, por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster. En algunas modalidades, el mamífero puede ser un mamífero agrícola (por ejemplo, equino, ovino, bovino, porcino, camélido) o un mamífero doméstico (por ejemplo, canino, felino).

Los términos "cantidad terapéuticamente aceptable" o "dosis terapéuticamente efectiva" se refieren de una manera intercambiable a una cantidad suficiente para efectuar el resultado deseado (es decir, una reducción en el colesterol no de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C) en plasma, hipercolesterolemia, aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria). En algunas modalidades, una cantidad terapéuticamente aceptable no induce ni provoca efectos secundarios indeseables. Una cantidad terapéuticamente aceptable se puede determinar administrando primero una dosis baja, y luego aumentando crecientemente esa dosis hasta lograr el efecto deseado. Una "dosificación profilácticamente efectiva" y una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo antagonizante de PCSK9 de la invención puede prevenir el establecimiento de, o puede dar como resultado una disminución en la gravedad de, respectivamente, los síntomas de la enfermedad asociados con la presencia de PCSK9 (por ejemplo, hipercolesterolemia). Estos términos también pueden promover o aumentar, respectivamente, la frecuencia y duración de los períodos libres de los síntomas de la enfermedad. Una "dosificación profilácticamente efectiva" y una "dosificación terapéuticamente efectiva" también puede prevenir o mitigar, respectivamente, el deterioro o la discapacidad debida a los trastornos y enfermedades resultantes de la actividad de PCSK9.

El término "co-administrar" se refiere a la presencia simultánea de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes

activos que se co-administran se pueden suministrar de una manera concurrente o en secuencia.

Como se utiliza en la presente, la frase “que consiste esencialmente en” se refiere a los géneros o especies de los agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o en una composición, así como cualesquiera excipientes inactivos para el propósito pretendido de los métodos o composiciones. En algunas modalidades, la frase “que consiste esencialmente en” excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales diferentes de un antagonista de anticuerpo anti-PCSK9 de la invención. En algunas modalidades, la frase “que consiste esencialmente en” excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales diferentes de un antagonista de anticuerpo anti-PCSK9 de la invención y un segundo agente co-administrado.

El término “estatina” se refiere a una clase de agentes farmacológicos que son inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA)-reductasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La Figura 2 ilustra las secuencias de aminoácidos de la cadena

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

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

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

15 Las Figuras 5A-C ilustran la prueba de ensayo ELISA del enlace de NVP-LGT209 (A), NVP-LGT210 (B), y NVP-LGT-211 (C) en comparación con NVP-LFU720-NX-4 a varios antígenos humanos y de ratón diferentes.

20 Las Figuras 6A-C ilustran el enlace de NVP-LGT209 (A), NVP-LGT210 (B), y NVP-LGT-211 (C) en un ELISA a la Pcsk9 humana y de cinomolgo. El anticuerpo secundario es de cabra anti-ratón, diluido a 1:5000. Solamente es el segundo como el control solo del anticuerpo secundario.

25 La Figura 7 ilustra que el anticuerpo monoclonal de ratón progenitor, NVP-LFU720 se enlaza al término C de PCSK9, los

residuos 680-692 (RSRHLAQASQELQ; SEQ ID NO: 49). Los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) LGT209, LGT210 y LGT211 compiten por el mismo epítipo. Mutante del término C A685X = SEQ ID NO: 56.

5 La Figura 8 ilustra que el anticuerpo de ratón progenitor NVP-LFU720 (5P20) altera pobremente la interacción de PCSK9 y LDL-R, como se determina en un ensayo bioquímico de transferencia de energía de resonancia con fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET). En contraste, 13C10 interrumpe la interacción FRET de
10 PCSK9-LDL-R con una IC₅₀ de 50 nM. La PCSK9 humana marcada con un fluoróforo (hPCSK9-AF) se incubó con NVP-LFU720-AX-1 o 13C10 en regulador de ensayo (HEPES 20 mM, pH de 7.2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, Tween 20 al 0.1 por ciento por volumen/volumen, y albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento en peso/volumen) durante
15 30 minutos a temperatura ambiente. Esto fue seguido por la adición del LDL-R marcado con europio (hLDL-R-Eu), y una incubación adicional a temperatura ambiente durante 90 minutos, de tal manera que las concentraciones finales fueron de hPcsk9-AF 8 nM y hLDL-R-Eu 1 nM. La señal de TR-FRET (330 nanómetros de excitación y 665
20 nanómetros de emisión) se midió con un lector de placas (EnVision 2100, Perkin Elmer), y se calculó el porcentaje de inhibición en la presencia de 5P20 ó 13C10. Los valores IC₅₀ se calcularon graficando los valores del porcentaje de inhibición en Prism (GraphPad). Cada punto de datos representa el promedio ± SD (n = 4
25 réplicas por punto). Los datos son representativos de cuando menos

dos experimentos independientes.

La Figura 9 ilustra que los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) LGT209, LGT210 y LGT211 son equivalentes al anticuerpo de ratón LFU720 en niveles iniciales a incrementados de absorción de LDL-R y LDL por parte de las células HepG2. Para la medición del LDL-R, las células se incubaron con anticuerpos de enlace de PCSK9 y se marcaron con anticuerpos anti-LDL-R. Para la absorción de LDL, las células se incubaron con anticuerpos de enlace de PCSK9, PCSK9, y Dil-LDL. Los anticuerpos de LDL-R y la fluorescencia de Dil-LDL se midieron mediante citometría de flujo. Para cada ensayo se muestra el promedio + SEM para las mediciones replicadas. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Para los ensayos de absorción de LDL, los anticuerpos de enlace de PCSK9 se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en DMEM conteniendo suero bovino fetal deficiente en lipoproteína al 10 por ciento (Intracel), y PCSK9 humana 200 nM (Hampton y colaboradores, PNAS (2007)104: 14604-14609), y se agregaron las soluciones del anticuerpo/PCSK9/medio a las células a las placas de 96 pozos, y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se agregó la LDL marcada con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indo-carbocianina (Dil-LDL, Biomedical Technologies), durante 2 horas adicionales. Entonces se aspiró el medio, las células se lavaron tres veces con suero regulado con fosfato, y las células se disociaron con tripsina-EDTA al 0.25 por

ciento. Las células se transfirieron entonces al regulador FACS (PBS
conteniendo suero bovino fetal al 5 por ciento, EDTA 2 mM, y azida
de sodio al 0.2 por ciento), se centrifugaron a 1000 x g durante 10
minutos, se aspiraron, y se fijaron en paraformaldehído al 1 por
5 ciento. La absorción de LDL se midió mediante fluorescencia Dil
celular (excitación a 488 nanómetros y emisión a 575 nanómetros)
utilizando citometría de flujo (Becton Dickinson LSR II). Para los
ensayos de LDL-R superficial, las células se incubaron con el medio
sin suero conteniendo anticuerpos, se lavaron con suero regulado
10 con fosfato, y se cosecharon en Versine (Biowhittaker, 17-771E), y
regulador FACS. Las células se transfirieron a nuevas placas, se
centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto durante 5 minutos, y se
bloquearon con IgG de conejo normal (MP Biomedicals). Las células
se marcaron con anticuerpos marcados con IgG de conejo anti-hLDL-
15 R-Alexa 647 (5 microgramos/mililitro) en regulador FACS, se
centrifugaron, se lavaron, y se fijaron en paraformaldehído al 1 por
ciento. El LDL-R superficial se midió mediante citometría de flujo
(excitación a 488 nanómetros y emisión a 633 nanómetros). Las
EC₅₀s se calcularon utilizando Prism (GraphPad).

20 La Figura 10 proporciona un esquema del diseño del estudio
para el modelo de ratón de infusión de PCSK9 humana, para
determinar el efecto de disminución del colesterol de los presentes
anticuerpos. LGT209, LGT210, y LGT211 son anticuerpos anti-
PCSK9 Humaneered^{MR} (humano-diseñados) que se enlazan con una
25 alta afinidad a hPCSK9 sin enlace alguno detectable a la PCSK9 de

murino. Para probar si LGT209, LGT210, o LGT211 podrían tanto inhibir la elevación del colesterol no de lipoproteína de alta densidad (no HDL) mediada por la hPCSK9 como prevenir la degradación del LDL-R hepático mediada por la PCSK9, los anticuerpos se inyectaron
5 cada uno en ratones 3 horas antes de la implantación de la mini-bomba osmótica que contenía la hPCSK9 (para la infusión continua). La cosecha de plasma y de tejido hepático se llevó a cabo 24 horas después de la inyección de la hPCSK9.

La Figura 11 muestra que el tratamiento con los anticuerpos
10 LGT209, LGT210 y LGT211 dio como resultado la acumulación de la PCSK9 humana (“hPCSK9”) en el modelo de infusión de ratón. Dicho de una manera breve, la hPCSK9 total se midió mediante un ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal 7D16 para la captura. El anticuerpo monoclonal 7D16 se enlaza a un epítipo diferente sobre
15 la PCSK9 que sobre LGT209, LGT210 y LGT211, y se puede utilizar para medir la PCSK9 total (libre y enlazada). El aumento observado en la hPCSK9 total presumiblemente se debe a un aumento en los complejos de hPCSK9/Ab. El anticuerpo libre se midió mediante un ELISA utilizando hPCSK9 para la captura. Este ensayo midió el
20 anticuerpo “libre” y posiblemente mide los complejos de 1:1 de Ab:PCSK9. Los ratones C57BL/6 se trataron con vehículo solo, con PCSK9 sola, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de LGT210, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de NVP-LGT211, o con una mezcla de IgG no específica de ratón (control negativo). Se grafican
25 los puntos de datos individuales, y se demarca el valor promedio

mediante una barra horizontal; $p < 0.05$ se consideró significativo.

Se cuantificaron los niveles de IgG en plasma mediante el ensayo Meso Scale Discovery (MSD). El anticuerpo libre se midió utilizando hPCSK9 para la captura. Este ensayo midió el anticuerpo
5 “libre” y posiblemente mide los complejos de 1:1 de Ab:PCSK9. Para el ensayo de IgG MSD, se utilizaron placas MSD Standard 96 (L11XA-3). Dicho de una manera breve, las placas se recubrieron con 25 a 28 microlitros de antígeno de captura, PCSK9-His, 1 microgramo/mililitro en suero regulado con fosfato (25-28
10 nanogramos/pozo) durante la noche a 4°C. La solución de recubrimiento se removió y las placas se bloquearon con 150 microlitros/pozo del Bloqueador MSD A al 5 por ciento (R93AA-2) con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa con suero regulado con fosfato + Tween-20 al 0.05 por
15 ciento (300 microlitros, 3 veces), se agregaron 25 microlitros de diluciones de calibrador de IgG (10 diluciones en serie con Bloqueador MSD A desde 10,000 hasta 0.0003 nanogramos/mililitro), diluciones desconocidas de muestras de plasma (10,000X con Bloqueador MSD A), o muestras de control de calidad, y se
20 incubaron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, se agregaron 25 microlitros/pozo de 1 microgramo/mililitro de anticuerpo de detección (anticuerpo de detección marcado con SULFO-TAG de cabra anti-ratón MSD, R32AC-5, diluido con albúmina de suero bovino al 1 por ciento / suero regulado con
25 fosfato / Tween 20 al 0.05 por ciento), y se incubaron con agitación

durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado y de la adición de 150 microlitros/pozo de regulador de lectura T 1X, la placa se leyó inmediatamente en un MSD SECTOR Imager 6000. Una gráfica de la curva estándar y las muestras desconocidas, se calcularon utilizando el software de análisis de datos MSD.

Los niveles tanto de IgG como de hPCSK9 en plasma se cuantificaron mediante el ensayo Meso Scale Discovery (MSD). El ensayo de hPCSK9 MSD es similar al ensayo de IgG, pero con las siguientes excepciones. Las placas se recubrieron con 25 a 28 microlitros de anticuerpo de captura (7D16.C3: 2.95 miligramos/mililitro) a 1 microgramo/mililitro. El anticuerpo monoclonal 7D16 se enlaza a un epítipo diferente sobre la PCSK9 que sobre LGT209, LGT210 y LGT211, y se puede utilizar para medir la PCSK9 total (libre y enlazada). Después del bloqueo de las placas, se incubaron 25 microlitros de diluciones calibradoras de hPCSK9 (10 puntos desde 10,000 hasta 0.0003 nanogramos/mililitro), y diluciones de muestras en plasma (10,000X con Bloqueador MSD A) con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por una incubación con el anticuerpo de detección primario (anticuerpo policlonal de conejo anti-PCSK9, Ab4, Conejo ID #RB11835 interno). Se agregó un paso de incubación con el anticuerpo de detección secundario (anticuerpo de detección marcado con SULFO-TAG de cabra anti-conejo MSD, R32AB-5), antes de la lectura con el MSD SECTOR Imager 6000. El aumento observado en la hPCSK9 total presumiblemente se debe a un aumento en los complejos de

hPCSK9/Ab. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando GraphPad Prism 4.02 (software GraphPad, San Diego, CA). Se utilizó el ANOVA de una vía para analizar las diferencias de grupos, y cuando se encontraron diferencias globales, se utilizó la prueba *post hoc* de Newman-Keuls para determinar las diferencias específicas entre los grupos tratados.

La Figura 12 ilustra que los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 conducen a la protección del LDL-R del hígado a partir de la degradación mediada por hPCSK9 en el modelo de infusión de ratón. Los ratones C57BL/6 se trataron con vehículo solo, con PCSK9 sola, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de LGT210, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de NVP-LGT211, o con la mezcla de IgG no específica de ratón (control negativo). Se ilustran muestras de hígado a partir de los animales individuales.

La electroforesis en gel de poli-acrilamida de las muestras de membrana de plasma se llevó a cabo utilizando un gel Midi Invitrogen del 4 al 12 por ciento de Bis-Tris de 20 pistas (Invitrogen WG1402BX10) con regulador de ejecución MOPS (Invitrogen NP0001). Las muestras preparadas se calentaron a 70°C durante 10 minutos, se colocaron sobre hielo, y entonces se utilizó un pipeteador de múltiples canales Matrix para cargar 10 microlitros de cada muestra sobre un gel. Se cargaron los marcadores SeeBlue Plus2 (Invitrogen LC5925) a lo largo de las muestras para la determinación del tamaño y de la orientación del gel. Los geles se ejecutaron a un voltaje constante de 200V hasta que el frente de

tinte alcanzó el fondo del gel. Después de la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen IB3010-01) utilizando una unidad iBlot (Invitrogen IB1001EU). La transferencia se llevó a cabo a 20V durante 7 minutos. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con el Pierce Superblock T20 (Pierce 37536) durante cuando menos 30 minutos. Las membranas se colocaron en bolsas para “sellar un alimento”, y entonces se agregó una dilución de 1:500 del anticuerpo de conejo anti-LDL-R en Superblock antes de la incubación durante la noche a 4°C con oscilación. Las membranas se enjuagaron en TBS/Tween al 0.05 por ciento 5 veces durante 5 minutos con oscilación, y entonces se agregó una dilución de 1:30,000 del anticuerpo secundario de HRP de cabra anti-conejo en Superblock a las membranas durante 1 hora. Las membranas se enjuagaron nuevamente en TBS/Tween al 0.05 por ciento 5 veces durante 5 minutos con oscilación. El conjugado de HRP se detectó utilizando un Sustrato Quimioluminiscente Pierce SuperSignal West Pico (Pierce 37079) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dicho de una manera breve, se mezclaron partes iguales de Solución de Peróxido y Luminol/Solución Mejoradora, y se agregaron a las membranas (0.2 mililitros/cm²) durante 5 minutos. El exceso de solución se removió mediante manchado, y las membranas se expusieron a la película de rayos-X Kodak BioMax MR (Kodak 870 1302) para la exposición.

Las Figuras 13A-C ilustran que los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 conducen a la reducción en el colesterol que no

es de lipoproteína de alta densidad (no HDL) en plasma en el modelo de infusión de hPCSK9 de ratón. La inyección previa del anticuerpo LGT209 dio como resultado una protección del 46 por ciento de la elevación en el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL) mediada por la hPCSK9. La inyección previa de LGT210 ó
5 LGT211 dio como resultado una protección equivalente o mayor de la elevación mediada por la hPCSK9 en el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL). 13C10 es un anticuerpo de murino anti-PCSK9 validado que se enlaza con una alta afinidad a la hPCSK9, y se utilizó como un control positivo para este ensayo. Los
10 ratones C57BL/6 se trataron con vehículo solo, con PCSK9 sola, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de LGT209, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de LGT210, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de NVP-LGT211, con PCSK9 + 20 miligramos/kilogramo de 13C10, o con la mezcla de IgG no específica de ratón (control
15 negativo). Los valores individuales se muestran con el valor promedio delineado como una barra horizontal. Para cuantificar el nivel de colesterol total en plasma, se utilizó el analizador clínico Olympus (Olympus America Inc.: Olympus AU400). Las muestras de
20 plasma se diluyeron a 1:3 en ddH₂O, y se cuantificaron 40 microlitros de las muestras de plasma diluidas para determinar el nivel de colesterol total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con el fin de cuantificar el colesterol HDL y no HDL en plasma, se obtuvieron fracciones de colesterol de lipoproteína utilizando Spife
25 3000 de Helena Laboratories. Todos los procedimientos, incluyendo

la preparación de muestras, la preparación del gel, la aplicación de las muestras, la electroforesis en gel, el teñido, el lavado, y el secado, se hicieron siguiendo las instrucciones proporcionadas en el manual del operador. Entonces el gel se escaneó en el Quick Scan
5 2000 utilizando la Ranura 5, y se calculó el porcentaje relativo de las fracciones de colesterol de lipoproteína utilizando el densitómetro Helena. Finalmente, se calcularon los valores absolutos de colesterol de HDL y no HDL mediante la multiplicación del porcentaje de cada fracción los niveles de colesterol total.

10 La Figura 14 ilustra los perfiles farmacocinéticos (PK) de rata para los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 (IgG1 humana silenciosa) en comparación con un perfil farmacocinético (PK) de IgG1 "típico". La vida media de los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 es notoriamente más larga (de 7 a 13 días) en comparación
15 con una vida media típica de IgG1 (aproximadamente 6 días) (por ejemplo, como se determina en un sujeto humano). No hubo evidencia alguna de de la disposición mediada por el objetivo (TMD), indicando que los anticuerpos no reaccionan cruzadamente con la PCSK9 de roedor). Para cada anticuerpo de prueba, 3 ratas Lewis
20 machos se inyectaron a 10 miligramos/kilogramo. En los tiempos = 0, 1, 6, 24 horas, 2, 4, 8 y 16 días, se muestrearon 250 microlitros de sangre, y el plasma aclarado se diluyó y se evaluó en un ELISA de captura (IgG de cabra anti-humano) para medir el anticuerpo humano total recuperado. También se generó una curva estándar para cada
25 anticuerpo de prueba. La cantidad de la IgG recuperada se graficó

contra la recuperación esperada de una IgG humana típica en una rata.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Introducción

5 Los anticuerpos y moléculas de enlace de antígeno de la presente invención específicamente se enlazan a la pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9a ("PCSK9"). Los presentes anticuerpos anti-PCSK9 y moléculas de enlace de antígeno se enlazan al término C de PCSK9 y tienen la propiedad inesperada de

10 interferir con la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) mediada por la PCSK9 sin interferir con el enlace de PCSK9 al LDL-R. En particular, los anticuerpos anti-PCSK9 y las moléculas de enlace de antígeno se enlazan a un epítipo dentro de los residuos 680-692 de la PCSK9, por ejemplo, un epítipo dentro de

15 la secuencia de aminoácidos RSRHLAQASQELQ (SEQ ID NO: 49), localizado en el extremo C-terminal de la PCSK9. Debido a que los anticuerpos y moléculas de enlace de antígeno de la invención se enlazan a PCSK9 mientras que se enlazan sobre una célula en lugar de hacerlo solamente a la PCSK9 circulante, tienen una vida media

20 *in vivo* comparativamente más larga en un paciente, por ejemplo, cuando menos de aproximadamente 7 días o más tiempo, y en algunas modalidades, proporcionan efectos de disminución de lípidos durante cuando menos 2 semanas después de su administración. Los anticuerpos anti-PCSK9 y las moléculas de enlace de antígeno de la

25 invención son antagonistas de PCSK9 en que previenen, reducen,

y/o inhiben la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) mediada por la PCSK9, facilitando de esta manera una mayor absorción del colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C). Los anticuerpos anti-PCSK9 y las moléculas de enlace de
5 antígeno encuentran uso en el tratamiento de los sujetos que padezcan, por ejemplo, dislipidemia, hipercolesterolemia, trigliceridemia, y otras condiciones de enfermedad mediadas por la PCSK9.

2. Anticuerpos Anti-PCSK9 Mejorados en General

10 Los fragmentos de anticuerpos anti-PCSK9 se pueden producir por cualquier medio conocido en la materia, incluyendo, pero no limitándose a, expresión recombinante, síntesis química, y digestión enzimática de los tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa se pueden obtener
15 mediante, por ejemplo, producción recombinante o hibridoma. La expresión recombinante puede ser a partir de cualesquiera células huésped apropiadas conocidas en la materia, por ejemplo, células huésped de mamífero, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insectos, etc. Cuando están
20 presentes, las regiones constantes de los anticuerpos anti-PCSK9 pueden ser de cualquier tipo o subtipo, como sea apropiado, y se pueden seleccionar a partir de las especies de sujetos que se vayan a tratar mediante los presentes métodos (por ejemplo, humanas, de primates o de otros mamíferos no humanos, por ejemplo, de
25 mamíferos agrícolas (por ejemplo, equino, ovino, bovino, porcino,

camélido), de mamíferos domésticos (por ejemplo, canino, felino), o de roedores (por ejemplo, rata, ratón, hámster, conejo). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 son humanizados o Humaneered^{MR} (humano-diseñados). En algunas modalidades, el

5 isotipo de la región constante es IgG, por ejemplo, IgG1. En algunas modalidades, la región constante de IgG1 humana se muta para tener una afinidad de enlace reducida por un ligando efector, tal como el receptor de Fc (FcR), por ejemplo, Fc gamma R1, sobre una célula o el componente de complemento C1. Véase, por ejemplo, la

10 Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,624,821. Los anticuerpos que contienen estas mutaciones median una reducción de, o ninguna citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos L234 y

15 L235 de la región constante de IgG1 están sustituidos por Ala234 y Ala235. La numeración de los residuos en la región constante de cadena pesada es aquella del índice de la Unión Europea (EU) (véase, Kabat y colaboradores (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Dept. Health and Human Services

20 (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos)). Véase también, por ejemplo, Woodle y colaboradores, *Transplantation* (1999) 68(5): 608-616; Xu y colaboradores, *Cell Immunol* (2000) 200(1): 16-26; y Hezareh y colaboradores, *J Virol* 75(24): 12161-8.

25 Los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de

antígeno de la invención también incluyen unidades de enlace de antígeno de un solo dominio, las cuales tienen un andamiaje de camélido. Los animales de la familia de camélidos incluyen camellos, llamas, y alpacas. Los camélidos producen anticuerpos funcionales desprovistos de cadenas ligeras. El dominio variable de cadena pesada (VH) se pliega de una manera autónoma y funciona independientemente como una unidad de enlace de antígeno. Su superficie de enlace involucra solamente tres regiones determinantes de complementariedad, comparándose con las seis regiones determinantes de complementariedad de las moléculas de enlace de antígeno clásicas (Fabs) o de los fragmentos variables de una sola cadena (scFvs). Los anticuerpos de camélido son capaces de obtener afinidades de enlace comparables a aquéllas de los anticuerpos convencionales. Las moléculas anti-PCSK9 basadas en el andamiaje de camélido, con especificidades de enlace de los anticuerpos anti-PCSK9 ejemplificados en la presente, se pueden producir empleando los métodos bien conocidos en la materia, por ejemplo, Dumoulin y colaboradores, *Nature Struct. Biol.* 11: 500–515, 2002; Ghahroudi y colaboradores, *FEBS Letters* 414: 521–526, 1997; y Bond y colaboradores, *J Mol Biol.* 332:643-55, 2003.

Los anticuerpos anti-PCSK9 mejorados de la invención son anticuerpos humanos diseñados con secuencias de la región-V que tienen una identidad sustancial de secuencia de aminoácidos con las secuencias de la línea germinal humana de la región-V, mientras que conservan la especificidad y afinidad de un anticuerpo de referencia.

Véanse la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2005/0255552 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2006/0134098, ambas de las cuales se incorporan a la presente como referencia. El

5 proceso de mejora identifica la información de secuencia mínima requerida para determinar la especificidad de enlace de antígeno a partir de la región variable de un anticuerpo de referencia, y transfiere esa información a una biblioteca de secuencias genéticas de la región-V parcial humana para generar una biblioteca enfocada

10 a los epítomos de regiones-V de anticuerpos humanos. Se puede utilizar un sistema de secreción basado en microbios para expresar los miembros de la biblioteca como fragmentos de anticuerpo Fab, y se rastrea la biblioteca para determinar los Fabs de enlace de antígeno, por ejemplo, utilizando un ensayo de enlace de

15 levantamiento de colonias. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2007/0020685. Adicionalmente se pueden caracterizar los clones positivos para identificar aquéllos con la afinidad más alta. Los Fabs humanos diseñados resultantes retienen la especificidad de enlace

20 del progenitor, el anticuerpo anti-PCSK9 de referencia, típicamente tienen una afinidad por el antígeno equivalente o más alta en comparación con el anticuerpo progenitor, y tienen regiones-V con un alto grado de identidad de secuencia comparándose con las regiones-V del anticuerpo de la línea germinal humana.

25 El determinante de especificidad de enlace (BSD) mínimo

requerido para generar la biblioteca enfocada a los epítomos, está típicamente representado por una secuencia dentro de la CDR3 de cadena pesada ("CDRH3"), y una secuencia dentro de la cadena ligera de la CDR3 ("CDRL3"). El determinante de especificidad de enlace puede comprender una porción o la longitud entera de una CDR3. El determinante de especificidad de enlace puede estar comprendido de residuos de aminoácidos contiguos o no contiguos. En algunos casos, la biblioteca enfocada a los epítomos se construye a partir de secuencias del segmento-V humanas enlazadas a la región CDR3-FR4 única a partir del anticuerpo de referencia que contiene el determinante de especificidad de enlace y las secuencias del segmento-J de la línea germinal humana (véanse, la Figura 1 y la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2005/0255552). De una manera alternativa, las bibliotecas del segmento-V humano se pueden generar mediante el reemplazo del casete secuencial, en donde solamente una parte del segmento-V del anticuerpo de referencia es inicialmente reemplazada por una biblioteca de secuencias humanas. Los "casetes" humanos identificados, que soportan el enlace en el contexto de las secuencias de aminoácidos residuales del anticuerpo de referencia, se recombinan entonces en un segundo rastreo de la biblioteca, para generar segmentos-V completamente humanos (véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2006/0134098).

En cada caso, se utilizan los segmentos de la CDR3 de cadena

pesada y ligera emparejados, los segmentos CDR3-FR4, o los segmentos-J, que contienen los determinantes de especificidad a partir del anticuerpo de referencia, para limitar la especificidad de enlace, de tal manera que los enlazadores de antígeno obtenidos a partir de la biblioteca retienen la especificidad del epítipo del anticuerpo de referencia. Se pueden introducir cambios de maduración adicionales en las regiones CDR3 de cada cadena para la construcción de la biblioteca, con el objeto de identificar los anticuerpos con una cinética de enlace óptima. Los anticuerpos humanos diseñados resultantes tienen secuencias del segmento-V derivadas a partir de las bibliotecas de la línea germinal humana, retienen la secuencia corta del determinante de especificidad de enlace (BSD) a partir de las regiones CDR3, y tienen regiones de estructura 4 (FR4) de la línea germinal humana.

De conformidad con lo anterior, en algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 contienen un determinante de especificidad de enlace (BSD) mínimo dentro de la CDR3 de las cadenas pesadas y ligeras derivadas a partir del anticuerpo monoclonal originador o de referencia. Las secuencias restantes de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera (CDR y FR), por ejemplo, el segmento-V y el segmento-J, son a partir de las secuencias de aminoácidos de la línea germinal humana y de afinidad madurada correspondientes. Los segmentos-V se pueden seleccionar a partir de una biblioteca de segmento-V humano. Se puede llevar a cabo un refinamiento adicional de la secuencia mediante maduración de

afinidad.

En otra modalidad, las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-PCSK9 contienen un segmento-V humano a partir de la secuencia de la línea germinal humana correspondiente (FR1-
5 CDR1-FR2-CDR2-FR3), por ejemplo, seleccionado a partir de una biblioteca del segmento-V humano, y un segmento de la secuencia de CDR3-FR4 a partir del anticuerpo monoclonal originador. El segmento de la secuencia de CDR3-FR4 se puede refinar adicionalmente, mediante el reemplazo de los segmentos de la
10 secuencia con la secuencia de la línea germinal humana correspondiente y/o mediante maduración de afinidad. Por ejemplo, la secuencia de FR4 y/o CDR3 que rodea al determinante de especificidad de enlace, puede ser reemplazada con la secuencia de la línea germinal humana correspondiente, mientras que se retiene el
15 determinante de especificidad de enlace a partir de la CDR3 del anticuerpo monoclonal originador.

En algunas modalidades, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento-V de cadena pesada es VhI-02. En algunas modalidades, la secuencia de la línea germinal
20 humana correspondiente para el segmento-J de cadena pesada es JH4. En algunas modalidades, el segmento-J de cadena pesada comprende la secuencia parcial de JH4 de la línea germinal humana WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 50). El segmento-J de longitud completa a partir del JH4 de la línea germinal humana es
25 YFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 51). Los genes de la región

variable son referenciados de acuerdo con la nomenclatura convencional para los genes de la región variable de inmunoglobulina. La información actual de los genes de inmunoglobulina está disponible a través de la red mundial, por ejemplo, en las bases de datos ImMunoGeneTics (IMGT), V-base, y PubMed. Véase también, Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001; 18(2): 100-16; Lefranc, *Exp Clin Immunogenet.* 2001; 18(3): 161-74; *Exp Clin Immunogenet.* 2001; 18(4): 242-54; y Giudicelli y colaboradores, *Nucleic Acids Res.*, 1 de Enero de 2005; 33 (Publicación de la base de datos): D256-61.

En algunas modalidades, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento-V de cadena ligera es VK3 L6. En algunas modalidades, la secuencia de la línea germinal humana correspondiente para el segmento-J de cadena ligera es Jk2. En algunas modalidades, el segmento-J de cadena ligera comprende la secuencia parcial de Jk2 de la línea germinal humana FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 52). El segmento-J de longitud completa a partir de la línea germinal humana Jk2 es YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 53).

En algunas modalidades, el segmento-V de cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 93 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento ó el 100 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS(D/T)MYMSWVRQAPGQG

LEWMGRIDPAN(A/E/G)HTNY(A/D)(P/Q)KFQ(A/G)RVTMTRDTSISTAY
 MELSRLTSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO:28). En algunas modalidades,
 el segmento-V de la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por
 ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 93 por ciento, el 95 por
 5 ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por
 ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia con la
 secuencia de aminoácidos QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF
 STMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPANEHTNYAQKFQGRVTMTRDTS
 ISTAYMELSRLTSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 27).

10 En algunas modalidades, el segmento-V de la cadena ligera
 tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por
 ciento, el 93 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por
 ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de
 identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos
 15 (E/Q)IV(L/M)TQSPATLSVSPGERATLSC(R/S)AS(Q/S)SVSYMHWYQQ
 KPGQAPRLLIY(G/L)(T/V)F(N/R)(L/R)A(S/T)GIPDRFSGSGSGTDFTLT
 GRLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 31). En algunas modalidades, el
 segmento-V de la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por
 ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 93 por ciento, el 95 por
 20 ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por
 ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia con la
 secuencia de aminoácidos QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQS
 VSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIGR
 LEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 29). En algunas modalidades, el
 25 segmento-V de la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por

ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 93 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV
 5 SYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIGRL
 EPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 30).

En algunas modalidades:

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3)
 10 de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos
 SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO: 14); y

ii) la región variable de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO: 26).

15 En algunas modalidades:

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; y

20 ii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención comprenden una región variable de cadena pesada, la cual
 25 comprende a CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos

(D/T)MYMS (SEQ ID NO: 8); una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos RIDPAN(A/E/G)HTNY(A/D)-(P/Q)KFQ(A/G) (SEQ ID NO: 11); y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SYYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO: 14).

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

En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada comprende una FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32; una FR2 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; una FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34; y una FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. Las secuencias de aminoácidos identificadas pueden tener uno o más aminoácidos sustituidos (por ejemplo, a partir de la maduración de
20 afinidad) o uno o dos aminoácidos conservadoramente sustituidos.

En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera comprende una FR1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; una FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; una FR3 que comprende la
25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38; y una FR4 que

comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39. Las secuencias de aminoácidos identificadas pueden tener uno o más aminoácidos sustituidos (por ejemplo, a partir de la maduración de afinidad) o uno o dos aminoácidos conservadoramente sustituidos.

5 Sobre su longitud completa, las regiones variables de los anticuerpos anti-PCSK9 de la presente invención, en términos generales, tendrán una identidad de secuencia de aminoácidos de la región variable total (por ejemplo, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) de cuando menos aproximadamente el 85 por ciento, por
10 ejemplo, de cuando menos aproximadamente el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento con la secuencia de aminoácidos de la región variable de la línea germinal humana
15 correspondiente. Por ejemplo, la cadena pesada de los anticuerpos anti-PCSK9 puede tener cuando menos aproximadamente el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100
20 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la línea germinal humana Vh1-02. La cadena ligera de los anticuerpos anti-PCSK9 puede tener cuando menos aproximadamente el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento,
25 el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento,

el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la línea germinal humana VK3 L6. En algunas modalidades, solamente se agregan, se suprimen, o se sustituyen los aminoácidos dentro de las regiones de estructura.

5 En algunas modalidades, la comparación de identidad de secuencia excluye la CD3.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden una región variable de cadena pesada que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por
10 ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 40, y comprenden una región variable de cadena
15 ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera
20 de la SEQ ID NO: 41 (es decir, secuencias en consenso).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden una región variable de cadena pesada que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por
ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por
25 ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por

ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, y comprenden una región variable de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 15 (es decir, LFU720 de ratón).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden una región variable de cadena pesada que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, y comprenden una región variable de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 (es decir, LGT-209).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden una región variable de cadena pesada que

tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de
5 secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, y comprenden una región variable de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el
10 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18 (es decir, LGT-210).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden una región variable de cadena pesada que
15 tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada
20 de la SEQ ID NO: 4, y comprenden una región variable de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de
25 secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera

de la SEQ ID NO: 16 (es decir, LGT-211).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden un polipéptido de cadena pesada que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3, y comprenden un polipéptido de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 (es decir, LGT-209).

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden un polipéptido de cadena pesada que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3, y comprenden un polipéptido de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 (es decir, LGT-209).

95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 19 (es decir, LGT-210).

5 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 de la invención comprenden un polipéptido de cadena pesada que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 5, y comprenden un polipéptido de cadena ligera que tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 (es decir, LGT-211).

20 Para las secuencias de aminoácidos identificadas, de menos de 20 aminoácidos de longitud, se pueden tolerar una o dos sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, mientras que todavía que conserve la actividad de enlace específico y/o antagonista deseada.

25 Los anticuerpos anti-PCSK9 de la presente invención, en términos generales, se enlazarán a la PCSK9 con una constante de

disociación en equilibrio (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-8} M ó 10^{-9} M, por ejemplo, de menos de aproximadamente 10^{-10} M ó 10^{-11} M, en algunas modalidades de menos de aproximadamente 10^{-12} M ó 10^{-13} M.

5 Los anticuerpos anti-PCSK9 opcionalmente se pueden multimerizar y utilizar de acuerdo con los métodos de esta invención. Los anticuerpos anti-PCSK9 pueden ser un anticuerpo tetramérico de longitud completa (es decir, que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas), un anticuerpo de una sola cadena (por ejemplo, 10 un scFv), o una molécula que comprende fragmentos de anticuerpos que forman uno o más sitios de enlace de antígeno y confieren especificidad de enlace de PCSK9, por ejemplo, la cual comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera (por ejemplo, Fab' u otros fragmentos similares).

15 La invención proporciona además polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente, por ejemplo, polinucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada o ligera o los segmentos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad, como se describe en la presente. En algunas 20 modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido 25 nucleico con un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que

consiste en SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por
5 ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 55.

10 En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por
15 ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97
20 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de la SEQ ID NO: 45 (es decir, LGT-209).

25 En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por

ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42. En
5 algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de
10 secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 44 (es decir, LGT-210).

En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por
15 ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 43. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena ligera
20 tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de
25 secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 45 (es decir, LGT-211).

En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento, el 89 por ciento, el 90 por ciento, el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 100 por ciento de identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de la SEQ ID NO: 55 (es decir, LFU720 de ratón).

3. Ensayos para Identificar los Anticuerpos Anti-PCSK9

Los anticuerpos antagonistas se pueden identificar mediante la generación de anticuerpos anti-PCSK9, y entonces se prueba cada anticuerpo para determinar su capacidad para reducir o inhibir los eventos mediados por PCSK9, por ejemplo, el enlace al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R), promoviendo la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R). Los ensayos se puede llevar a cabo *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos preferidos se enlazan a PCSK9, no impiden el enlace de la PCSK9 con el receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R), y reducen o inhiben la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) mediada por PCSK9.

El enlace de los anticuerpos o moléculas de enlace de antígeno con la PCSK9 se puede determinar utilizando cualquier método conocido en la materia, incluyendo, sin limitación, ELISA, Biacore y Western Blot.

5 La degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) mediada por la PCSK9 también se puede medir utilizando cualquier método conocido en la materia. En una modalidad, la capacidad del anticuerpo anti-PCSK9 o de la molécula de enlace de antígeno para inhibir la degradación del receptor de lipoproteína de

10 baja densidad (LDL-R) se determina utilizando un modelo de infusión de ratón. Los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno se infunden intravenosamente (por ejemplo, 3 microgramos/hora) en un ratón, y se determinan los niveles del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) en preparaciones

15 de membrana de hígado en comparación con los niveles del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) en preparaciones de membrana de hígado a partir de un ratón que haya recibido infusiones intravenosas de un anticuerpo de control (por ejemplo, que se enlace a un antígeno no relacionado). Los ratones que hayan

20 recibido los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 tendrán niveles detectablemente más altos del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R), por ejemplo, cuando menos el 10 por ciento, el 20 por ciento, el 50 por ciento, el 80 por ciento, o el 100 por ciento más

25 altos, en comparación con los ratones que hayan recibido el anticuerpo de control.

Los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 también se pueden probar para determinar su eficacia terapéutica para reducir los niveles en plasma de LCL-C, no HDL-C y/o colesterol total. Los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno se infunden intravenosamente (por ejemplo, 3 microgramos/hora) en un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, primate no humano, ser humano), y se determinan los niveles en plasma de LCL-C, no HDL-C y/o colesterol total en comparación con los niveles en plasma de LCL-C, no HDL-C y/o colesterol total a partir del mismo mamífero antes del tratamiento o a partir de un mamífero que haya recibido infusiones intravenosas de un anticuerpo de control (por ejemplo, que se enlace a un antígeno no relacionado). El mamífero que haya recibido los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 tendrá niveles detectablemente más bajos en plasma de LCL-C, no HDL-C y/o colesterol total, por ejemplo, cuando menos el 10 por ciento, el 20 por ciento, el 50 por ciento, el 80 por ciento, o el 100 por ciento más bajos, en comparación con el mamífero antes del tratamiento o con el mamífero que haya recibido el anticuerpo de control.

4. Composiciones que comprenden anticuerpos anti-PCSK9

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los presentes anticuerpos anti-PCSK9 o moléculas de enlace de antígeno formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones adicionalmente pueden contener otros agentes terapéuticos que sean adecuados para el tratamiento o la prevención de un trastorno dado. Los

vehículos farmacéuticamente aceptables mejoran o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y/o el modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, o que se administre próxima al sitio del objetivo. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, intranasal, por inhalación, espinal, o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, la molécula biespecífica y multiespecífica, se puede recubrir en un material para proteger al compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Los anticuerpos, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden hacer en formulaciones de aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para administrarse por medio de inhalación. Las formulaciones de aerosol se pueden poner en propelentes aceptables presurizados, tales como dicloro-difluoro-

metano, propano, nitrógeno, y similares.

En algunas modalidades, la composición es estéril y fluida. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del
5 tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, poli-alcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio, en la composición. Se puede provocar la absorción de largo plazo de las composiciones
10 inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos bien conocidos y
15 rutinariamente practicados en este campo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son determinados en parte por la composición particular que se esté administrando, así como por el método particular empleado para administrar la composición. De conformidad con lo anterior, hay una amplia variedad de
20 formulaciones adecuadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los métodos aplicables para formular los anticuerpos y determinar la dosificación y programación apropiadas, se pueden encontrar, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a Edición, University of the Sciences in
25 Philadelphia, Editores, Lippincott Williams & Wilkins (2005); y en

Martindale: The Complete Drug Reference, Sweetman, 2005, Londres: Pharmaceutical Press., y en Martindale, *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 31^a Edición., 1996, Amer Pharmaceutical Assn, y Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, Editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978, cada uno de los cuales se incorpora a la presente como referencia. Las composiciones farmacéuticas de preferencia se elaboran bajo condiciones GMP. Típicamente, se emplea una dosis terapéuticamente efectiva o una dosis eficaz el anticuerpo anti-PCSK9 en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos anti-PCSK9 se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante los métodos convencionales conocidos por los expertos en este campo. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). En la determinación de una dosis terapéuticamente o profilácticamente efectiva, se puede administrar una dosis baja, y entonces se aumenta crecientemente hasta que se logre una respuesta deseada con efectos secundarios indeseados mínimos o nulos. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a través del tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, como sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es en especial conveniente formular las composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación para mayor facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de

dosificación, como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se vayan a tratar; cada unidad contiene una cantidad previamente determinada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particular, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o del éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular, que se estén empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente que se esté tratando, y factores similares.

En algunas modalidades, las composiciones farmacológicas comprenden una mezcla del anticuerpo anti-PCSK9 o de la molécula de enlace de antígeno, y un segundo agente farmacológico. Por

ejemplo, las composiciones pueden comprender un anticuerpo anti-PCSK9 o molécula de enlace de antígeno de la invención y un agente que se sepa que es benéfico para reducir el colesterol, incluyendo LDL-C, no HDL-C y colesterol total y/o para elevar el HDL-C.

5 Los segundos agentes de ejemplo para incluirse en las mezclas con el presente anticuerpo antagonista anti-PCSK9 o molécula de enlace de antígeno incluyen, sin limitación, un inhibidor de HMG-CoA-reductasa (es decir, una estatina), fibratos (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato), niacina
10 y análogos de la misma, inhibidores de la absorción de colesterol, secuestrantes de ácido biliar (por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesvelam), un inhibidor del transporte de ácido biliar ileal (IBAT), un mimético de hormona tiroides (por ejemplo, el compuesto KB2115), un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos
15 microsomal, un agonista doble alfa y gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR), un inhibidor de acil-transferasa de acil-CoA:diacil-glicerol (DGAT), un inhibidor de acil-transferasa de acil-CoA:colesterol (ACAT), un inhibidor de Niemann
20 Pick 1 tipo-C1 (NPC1-L1) (por ejemplo, ezetimiba), un agonista de las proteínas de Casete de Enlace de ATP (ABC) G5 ó G8, un inhibidor de la proteína de transferencia de colesterol-éster (CETP), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la apoB100. Los agentes que disminuyen los
25 *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,*

11^a Edición, Brunton, Lazo y Parker, Editores, McGraw-Hill (2006);
2009 Physicians' Desk Reference (PDR), por ejemplo, en la 63^a
 (2008) Editores, Thomson PDR.

Los agentes que disminuyen los lípidos adicionales útiles en
 5 las presentes composiciones se describen y/o se revisan, por
 ejemplo, en Chang y colaboradores, *Curr Opin Drug Disco Devel*
 (2002) 5(4): 562-70; Sudhop y colaboradores, *Drugs* (2002) 62(16):
 2333-47; Bays y Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11):
 1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar (134): 45-50;
 10 Tomoda y Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3): 375-89;
 Tenenbaum y colaboradores, *Adv Cardiol* (2008) 45: 127-53; Tomkin,
Diabetes Care (2008) 31(2): S241-S248; Lee y colaboradores, *J*
Microbiol Biotechnol (2008) 18(11): 1785-8; Oh y colaboradores, *Arch*
Pharm Res (2009) 32(1): 43-7; Birch y colaboradores, *J Med Chem*
 15 (2009) 52(6): 1558-68; y Baxter y Webb, *Nature Reviews Drug*
Discovery (2009) 8: 308-320.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o las
 moléculas de enlace de antígeno de la invención se proporcionan
 como una mezcla con una estatina. Las estatinas de ejemplo
 20 incluyen, sin limitación, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina,
 lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y
 simvastatina.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o las
 moléculas de enlace de antígeno de la invención se proporcionan
 25 como una mezcla con un agente farmacológico que induce

hipercolesterolemia o trigliceridemia. Por ejemplo, el segundo agente farmacológico puede ser un inhibidor de proteasa, por ejemplo, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudina-zidovudina (Trizivir). En algunas modalidades, el segundo agente farmacológico es Tacrolimus.

5. Métodos para utilizar Anticuerpos anti-PCSK9

a. Condiciones sujetas al tratamiento con anticuerpos anti-PCSK9

Los anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 y las moléculas de enlace de antígeno de la invención encuentran uso en el tratamiento de cualquier condición de enfermedad mediada por la actividad o la sobre-actividad de PCSK9.

Por ejemplo, los individuos que tienen o que están en riesgo de desarrollar dislipidemia o hipercolesterolemia por cualquier número de razones o etiologías, pueden beneficiarse de la administración de los presentes anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 y moléculas de enlace de antígeno. Por ejemplo, el individuo puede tener hipercolesterolemia homocigótica o heterocigótica familiar o genéticamente transmitida en donde esté presente un receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) funcional. Las mutaciones genéticas asociadas con y/o causantes de hipercolesterolemia familiar o genéticamente heredada se resumen, por ejemplo, en Burnett y Hooper, *Clin Biochem Rev* (2008) 29(1): 11-26. El individuo también puede tener otras condiciones de

enfermedad o puede dedicarse a comportamientos que contribuyan a, o que aumenten, el riesgo de desarrollar dislipidemia o hipercolesterolemia. Por ejemplo, el individuo puede ser obeso, o puede padecer diabetes o síndrome metabólico. El individuo puede ser un fumador, puede llevar un estilo de vida sedentaria, o puede tener una dieta alta en colesterol.

La dirección a la PCSK9 es útil para la reducción, reversión, inhibición, o prevención de dislipidemia, hipercolesterolemia y trigliceridemia post-prandial. Véase, por ejemplo, Le May y colaboradores, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29(5): 684-90; Seidah, *Expert Opin Ther Targets* (2009) 13(1): 19-28; y Poirier y colaboradores, *J Biol Chem* (2009) PMID 19635789. De conformidad con lo anterior, la administración de los presentes anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 y moléculas de enlace de antígeno encuentra uso en la reducción, reversión, inhibición, y prevención de dislipidemia, hipercolesterolemia, y trigliceridemia post-prandial en un individuo que lo necesite.

Los presentes anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 y moléculas de enlace de antígeno encuentran uso en la reducción o disminución de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en un individuo que lo necesite. El individuo puede tener niveles persistentemente elevados de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C). En algunas modalidades, el individuo tiene niveles en plasma de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) consistentemente arriba de 80 miligramos/decilitro, por ejemplo

arriba de 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 miligramos/decilitro, o más altos. Los presentes anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 y moléculas de enlace de antígeno también encuentran uso en la reducción o disminución del colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C) o del colesterol total en un individuo que lo necesite.

El individuo puede ya estar tomando otro agente farmacológico para reducir el colesterol, y puede ser resistente o intolerante a este agente. Por ejemplo, el individuo puede ya estar bajo un régimen terapéutico con una estatina, el cual puede haber probado ser ineficaz en este individuo para reducir el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C), el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C), o el colesterol total hasta niveles aceptables. El individuo también puede ser intolerante a la administración de una estatina. La administración combinada de los presentes anticuerpos antagonistas anti-PCSK9 y moléculas de enlace de antígeno con un segundo agente útil para reducir el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) o el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C) y/o para elevar el colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C) mejorará la eficacia y tolerancia del segundo agente, por ejemplo, al permitir que se administre una dosis más baja del segundo agente para.

En algunas modalidades, el individuo tiene una mutación de ganancia de función en el gen de PCSK9, por ejemplo, que da

como resultado un incremento aberrante en la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R).

En algunas modalidades, el individuo está recibiendo un agente farmacológico que induce dislipidemia o hipercolesterolemia, es decir, el individuo tiene dislipidemia o hipercolesterolemia inducida por fármacos. Por ejemplo, el individuo puede estar recibiendo un régimen terapéutico de inhibidores de proteasa, por ejemplo, para el tratamiento de una infección por VIH. Otro agente farmacológico que se sabe que provoca niveles elevados de triglicéridos en plasma es el Tacrolimus, un fármaco inmunosupresor administrado a los pacientes con trasplante. Se ha demostrado que la ciclosporina aumenta la lipoproteína de baja densidad (LDL) de una manera significativa. Véase, por ejemplo, Ballantyne y colaboradores (1996) 78(5): 532-5. Los anti-psicóticos de segunda generación (por ejemplo, aripiprazol, clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, y ziprasidona) también se han asociado con la dislipidemia. Véase, por ejemplo, Henderson, *J Clin Psychiatry* (2008) 69(2): e04 y Brooks y colaboradores, *Curr Psychiatry Rep* (2009) 11(1): 33-40.

b. Administración de anticuerpos anti-PCSK9

Un médico o veterinario puede empezar con dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición farmacéutica en niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado, y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, la dosis efectiva

de las composiciones de la presente invención varía dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo la enfermedad o condición específica que se vaya a tratar, el medio de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones del tratamiento se necesitan titular para optimizar la seguridad y la eficacia. Para su administración con un anticuerpo, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0.0001 a 100 miligramos/kilogramo, y más usualmente de 0.01 a 5 miligramos/kilogramo, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser de 1 miligramo/kilogramo de peso corporal ó de 10 miligramos/kilogramo de peso corporal, o pueden estar dentro del intervalo de 1 a 10 miligramos/kilogramo. La dosificación puede ser diaria, semanal, quincenal, mensual, o con más o menos frecuencia, como sea necesario o deseado. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes, o una vez cada 3 a 6 meses.

En algunas modalidades, se administra un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-PCSK9 o una molécula de enlace de antígeno de la invención. En las modalidades en donde el agente es un ácido nucleico, las dosificaciones típicas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0.1 miligramos/kilogramo de peso corporal hasta e incluyendo aproximadamente 100 miligramos/kilogramo de peso corporal, por ejemplo, entre aproximadamente 1

miligramo/kilogramo de peso corporal y aproximadamente 50 miligramos/kilogramo de peso corporal. En algunas modalidades, son de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ó 50 miligramos/kilogramo de peso corporal.

5 El anticuerpo se puede administrar en dosis individuales o divididas. El anticuerpo usualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser semanalmente, quincenalmente, mensualmente, o
10 anualmente, como sea necesario o deseado. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indique mediante la medición de niveles en sangre del anticuerpo anti-PCSK9 en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración del anticuerpo en plasma de 1 a 1000 microgramos/
15 mililitro, y en algunos métodos, de 25 a 300 microgramos/mililitro. De una manera alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso, se requiere una
20 administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran una vida media
25 más larga que aquélla de los anticuerpos quiméricos y de los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos
relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo.

Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de su vida. En las aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o se termine el progreso de la enfermedad, y de preferencia hasta que el paciente muestre una mitigación parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PCSK9 o el agente de enlace de antígeno se administra cuando los niveles en plasma de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en el paciente se elevan por arriba de un nivel umbral previamente determinado, por ejemplo, hasta cuando menos aproximadamente 80 miligramos/decilitro, por ejemplo, hasta cuando menos aproximadamente 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 miligramos/decilitro, o más altos.

c. Co-administración con un segundo agente

El antagonista de anticuerpo de PCSK9 se puede utilizar en combinación con agentes que se sepa que son benéficos para reducir el colesterol, incluyendo el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C), el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C), y el colesterol total, y/o para elevar el colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C).

Los agentes activos se pueden administrar juntos en una mezcla con el anticuerpo antagonista anti-PCSK9, o cada agente se puede administrar por separado. El agente de anticuerpo y el otro

agente activo se pueden administrar, pero necesitan administrarse, de una manera concurrente.

Los segundos agentes de ejemplo para utilizarse en co-administración con el presente anticuerpo antagonista anti-PCSK9 o la molécula de enlace de antígeno incluyen, sin limitación, un
 5 inhibidor de HMG-CoA-reductasa (es decir, una estatina), fibratos (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato), niacina y análogos de la misma, inhibidores de la absorción de colesterol, secuestrantes de ácido biliar (por ejemplo,
 10 colestiramina, colestipol, colesvelam), un inhibidor del transporte de ácido biliar ileal (IBAT), un mimético de hormona tiroides (por ejemplo, el compuesto KB2115), un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos microsomal, un agonista doble alfa y gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma
 15 (PPAR), un inhibidor de acil-transferasa de acil-CoA:diacil-glicerol (DGAT), un inhibidor de acil-transferasa de acil-CoA:colesterol (ACAT), un inhibidor de Niemann Pick 1 tipo-C1 (NPC1-L1) (por ejemplo, ezetimiba), un agonista de las proteínas de Casete de Enlace de ATP (ABC) G5 ó G8, un inhibidor de la proteína de
 20 transferencia de colesterol-éster (CETP), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la apoB100.

Los agentes reductores de lípidos útiles adicionales se describen y/o se revisan, por ejemplo, en Chang y colaboradores,
 25 *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4): 562-70; Sudhop y

colaboradores, *Drugs* (2002) 62(16): 2333-47; Bays y Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11): 1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar (134): 45-50; Tomoda y Omura, *Pharmacol Ther* (2007) 115(3): 375-89; Tenenbaum y colaboradores, *Adv Cardiol* (2008) 45: 127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2): S241-S248; Lee y colaboradores, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11): 1785-8; Oh y colaboradores, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch y colaboradores, *J Med Chem* (2009) 52(6): 1558-68; y Baxter y Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8: 308-320.

10 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno de la invención se co-administran con una estatina. Las estatinas de ejemplo incluyen, sin limitación, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y
15 simvastatina.

 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno de la invención se co-administran con un agente farmacológico que induzca hipercolesterolemia o trigliceridemia. Por ejemplo, el segundo agente
20 farmacológico puede ser un inhibidor de proteasa, por ejemplo, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudina-zidovudina (Trizivir). En algunas modalidades, el segundo agente farmacológico es Tacrolimus.

25 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o

las moléculas de enlace de antígeno de la invención se co-administran con un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, un siARN, un miARN, una secuencia anti-sentido, una ribozima) que se dirija específicamente a PCSK9 o a apoB100.

5 **6. Kits**

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden proporcionar en un kit. En ciertas modalidades, un kit de la presente invención comprende un anticuerpo antagonista anti-PCSK9 o una molécula de enlace de antígeno de la invención, como se describe en la presente. Los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno se pueden proporcionar en dosificaciones uniformes o variables.

En algunas modalidades, los kits comprenden uno o más segundos agentes farmacológicos, como se describen en la presente. El segundo agente farmacológico se puede proporcionar en la misma formulación o en formulaciones separadas de los anticuerpos anti-PCSK9 o de las moléculas de enlace de antígeno. Las dosificaciones de los primeros y los segundos agentes pueden ser independientemente uniformes o variables.

En algunas modalidades, los kits comprenden el antagonista de anticuerpo de PCSK9 y uno o más agentes que se sepa que son benéficos para reducir el colesterol, incluyendo el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C), el colesterol que no es de lipoproteína de alta densidad (no HDL-C), y el colesterol total, y/o para elevar el colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL-C).

Los segundos agentes de ejemplo para incluirse en los kits con el presente anticuerpo antagonista anti-PCSK9 o la molécula de enlace de antígeno incluyen, sin limitación, un inhibidor de HMG-CoA-reductasa (es decir, una estatina), fibratos (por ejemplo, 5 clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato), niacina y análogos de la misma, inhibidores de la absorción de colesterol, secuestrantes de ácido biliar (por ejemplo, colestiramina, colestipol, colesvelam), un inhibidor del transporte de ácido biliar ileal (IBAT), un mimético de hormona tiroides (por ejemplo, el compuesto 10 KB2115), un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos microsomal, un agonista doble alfa y gamma del receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR), un inhibidor de acil-transferasa de acil-CoA:diacil-glicerol (DGAT), un inhibidor de acil-transferasa de acil-CoA:colesterol (ACAT), un inhibidor de Niemann 15 Pick 1 tipo-C1 (NPC1-L1) (por ejemplo, ezetimiba), un agonista de las proteínas de Casete de Enlace de ATP (ABC) G5 ó G8, un inhibidor de la proteína de transferencia de colesterol-éster (CETP), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la apoB100.

20 Los agentes reductores de lípidos útiles adicionales en los kits se describen y/o se revisan, por ejemplo, en Chang y colaboradores, *Curr Opin Drug Disco Devel* (2002) 5(4): 562-70; Sudhop y colaboradores, *Drugs* (2002) 62(16): 2333-47; Bays y Stein, *Expert Opin Pharmacother* (2003) 4(11): 1901-38; Kastelein, *Int J Clin Pract Suppl* (2003) Mar (134): 45-50; Tomoda y Omura, *Pharmacol Ther* 25

(2007) 115(3): 375-89; Tenenbaum y colaboradores, *Adv Cardiol* (2008) 45: 127-53; Tomkin, *Diabetes Care* (2008) 31(2): S241-S248; Lee y colaboradores, *J Microbiol Biotechnol* (2008) 18(11): 1785-8; Oh y colaboradores, *Arch Pharm Res* (2009) 32(1): 43-7; Birch y
 5 colaboradores, *J Med Chem* (2009) 52(6): 1558-68; y Baxter y Webb, *Nature Reviews Drug Discovery* (2009) 8: 308-320.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno de la invención se proporcionan en kits con una estatina. Las estatinas de ejemplo incluyen, sin
 10 limitación, atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y simvastatina.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PCSK9 o las moléculas de enlace de antígeno de la invención se proporcionan en
 15 kits con un agente farmacológico que induzca hipercolesterolemia o trigliceridemia. Por ejemplo, el segundo agente farmacológico puede ser un inhibidor de proteasa, por ejemplo, Saquinavir, Ritonavir, Indinavir, Nelfinavir, Amprenavir, Lopinavir, Atazanavir, Fosamprenavir, Tipranavir, Darunavir, abacavir-lamivudina-
 20 zidovudina (Trizivir). En algunas modalidades, el segundo agente farmacológico es Tacrolimus.

EJEMPLOS

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

25 **Ejemplo 1: Generación e Identificación del Agonista de**

Pcsk9, NVPLFU720

Compendio

Se llevaron a cabo estudios para generar un antagonista de anticuerpo funcional contra Pcsk9. Se identificaron múltiples
 5 hibridomas que secretaban un anticuerpo capaz de enlazarse una versión de la proteína marcada con His. Los anticuerpos a partir de hibridomas se evaluaron para determinar su actividad antagonista funcional medida por su capacidad para inhibir la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) mediada por
 10 Pcsk9 en células HepG2 lo cual da como resultado un aumento en la capacidad de estas células para absorber el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C). Se identificó un potente anticuerpo monoclonal de IgG1-kappa de murino anti-PCSK9 humana funcional, y se designó como NVP-LFU720 (LFU720).

Métodos

Antígeno y otras proteínas

Se generó una línea celular de expresión estable que secretaba la proteína PCSK9 humana mediante la transfección de las células HEK293 Freestyle^{MR} (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Dicho de una
 20 manera breve, las células cultivadas en el medio Freestyle^{MR} (Invitrogen) más suero fetal de becerro al 10 por ciento en el modo adherente en matraces BioCoat (Becton Dickinson) se transfectaron utilizando el reactivo de transfección de Lipofectamina 2000^{MR} y un plásmido recombinante que proporcionó la secuencia de señal de
 25 melitina, el ADNc de Pcsk9 maduro (aminoácidos 31-692), y una

marca his6 (SEQ ID NO: 57) en el término C de la secuencia (clonada por E. Hampton, GNF, NPL 010051). 48 horas después de la transfección, se inició la selección de los transfectantes positivos mediante la adición de 100 microgramos/mililitro de Zeocina en el medio de cultivo. Cuatro semanas más tarde, emergieron cuatro reservas celulares estables de células productoras de Pcsk9. La reserva 4, que fue la de más alta producción, se adaptó a las condiciones de suspensión sin suero en el medio Freestyle^{MR}, y subsiguientemente se escaló hacia arriba para la producción a gran escala, utilizando el bio-reactor Wave^{MR} en un volumen de producción a una escala de 10 a 20 litros.

Se llevaron a cabo varias ejecuciones a través del tiempo, proporcionando la proteína recombinante producida a velocidades de entre 12 y 30 miligramos/litro. Los sobrenadantes celulares se cosecharon y se concentraron mediante filtración de flujo atravesado. El concentrado resultante se aplicó a una columna Superflow de Enlace de His NiNTA de 25 mililitros (equilibrada con Tris 50 mM/NaCl 300 mM/CaCl₂ 1 mM/ β -Mercaptoetanol 2 mM, pH de 7.4) a 0.5 mililitros/minuto. Después del lavado de la línea base con Tris 50 mM/NaCl 300 mM/Imidazol 20 mM, pH de 7.4, el material enlazado se eluyó con Tris 50 mM/NaCl 300 mM/Imidazol 250 mM, pH de 7.4. El eluato resultante se dializó contra suero regulado con fosfato (PBS), pH de 7.3, se filtró para esterilizarse, y se dividió en alícuotas. Se analizó una muestra mediante cromatografía analítica por exclusión de tamaños para la determinación de la

oligomerización. El cromatograma de HPLC obtenido de la proteína purificada muestra dos picos, contando el mayor por el 85 por ciento. El análisis de HPLC-ESI MS de la proteína de longitud completa revela una masa de 58176.0 Da, la cual está de acuerdo con la masa esperada a partir de aa31-692-His de melitina-hsPcsk9 con todos los residuos de cisteína oxidados. Parte de la muestra adicionalmente se N-glicosila. La proteína contaminante de una masa de aproximadamente 13 kD muy probablemente se parece al prodominio libre de la proteína. Se produjeron los homólogos correspondientes de Pcsk9 a partir de ratón y de mono cinomolgo en planteamientos de expresión transitoria a gran escala, utilizando nuevamente las células HEK293 Freestyle cultivadas en una suspensión sin suero en el medio Freestyle. Los plásmidos recombinantes, el ADNc de Pcsk9 de ratón que proporciona una secuencia líder natural y una marca his6 (SEQ ID NO: 57) en el término C, y la Pcsk9 de cinomolgo que proporciona una secuencia líder de CD33 y una marca his6 C-terminal (SEQ ID NO: 57), se transfectaron en las células Freestyle utilizando Polietilenimina como portadora del ADN del plásmido en una proporción de 1:3 (microgramos/mililitro : microgramos/mililitro de AD : PEI). Las ejecuciones de producción se llevaron a cabo en la escala de 10 litros en los bio-reactores Wave^{MR}; la purificación y caracterización de la proteína se hicieron de una manera análoga a los protocolos descritos anteriormente para la proteína Pcsk9 humana. Los rendimientos para la proteína Pcsk9 de ratón estuvieron en el

intervalo de entre 0.7 y 2.7 miligramos/litro de cultivo, y la Pcsk9 de cinomolgo se obtuvo a 3.1 miligramos/litro.

Generación de hibridoma

Inmunización de Ratones y Producción de Hibridomas

5 La Pcsk9 purificada se diluyó a 1:1 con Adyuvante Completo de Freund antes de la inmunización de los ratones transgénicos Bcl-2 (C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 raza wehi). Los ratones se inmunizaron utilizando un procedimiento que pide la Inmunización Repetitiva en Múltiples Sitios (RIMMS). Dicho de una manera breve, los ratones se
10 inyectaron con 1 a 3 microgramos del antígeno en 8 sitios específicos proximales a los ganglios linfáticos periféricos (PLN). Este procedimiento se repitió 6 veces durante un período de 12 días. En el día 12, se recolectó una extracción de sangre de prueba, y se analizó la titulación del anticuerpo en suero mediante ELISA. Los
15 ganglios linfáticos periféricos (PLN) reservados se removieron de los ratones con alta titulación en el día 15. Para cosechar los linfocitos, los ganglios linfáticos periféricos (PLN) se lavaron dos veces con DMEM solo, y entonces se disociaron pasándolos a través de una malla de 22 micras (Falcon #352350). Los linfocitos resultantes se
20 lavaron 2 veces adicionales antes de la fusión. Las células de mieloma NSO/Bcl-2 se mezclaron con los linfocitos en una proporción de 2.5 linfocitos para 1 célula NSO. La mezcla de células se centrifugó, y subsiguientemente se agregó por goteo 1 mililitro de PEG 1500 al aglomerado celular durante 1 minuto. Después de 30
25 segundos, se agregó lentamente 1 mililitro de DMEM, y 1 minuto

después, se agregaron 19 mililitros de DMEM durante 5 minutos. Las células fusionadas se aglomeraron, se volvieron a suspender en una densidad de 2×10^5 células/mililitro en un medio HAT (DMEM + FBS al 20 por ciento, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HAT, 0.5x HFCS), y se colocaron a 37°C durante una hora. Las células entonces se aplicaron a placas de 384 pozos a 60 microlitros / pozo.

Rastreo de Hibridomas que Secretan Anticuerpos Funcionales para Pcsk9

Diez días después de la fusión, se rastrearon las placas de hibridoma para determinar la presencia de anticuerpos específicos de Pcsk9. Para el rastreo mediante ELISA, las placas Maxisorp de 384 pozos (Nunc #464718) se recubrieron con 50 microlitros de Pcsk9 (diluida hasta 15 nanogramos/pozo en suero regulado con fosfato), y se incubaron durante la noche a 4°C. La proteína restante se aspiró, y los pozos se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 por ciento en suero regulado con fosfato. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, los pozos se lavaron cuatro veces con suero regulado con fosfato + Tween al 0.05 por ciento (PBST). Se transfirieron 15 microlitros de sobrenadante de hibridoma a las placas ELISA. 15 microlitros de suero de ratón, tomado en el momento de la remoción de los ganglios linfáticos periféricos (PLN), se diluyeron a 1:1000 en suero regulado con fosfato, y se agregaron como un control positivo. 50 microlitros del anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón – HRP (Jackson Immuno Research #115-035-071), diluida a 1:5000 en suero regulado con fosfato), se

agregaron a todos los pozos de las placas ELISA. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, las placas se lavaron ocho veces con PBST. Se agregaron 25 microlitros de TMB (KPL #50-76-05), y después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente; las placas se leyeron a una absorbencia de 605 nanómetros. Las células a partir de los pozos positivos se expandieron en placas de 24 pozos en un medio HT (DMEM + FBS al 20 por ciento, Pen/Strep/Glu, 1x NEAA, 1x HT, 0.5x HFCS).

Purificación de anticuerpos

El sobrenadante que contenía LFU720 se purificó utilizando proteína G (Upstate # 16-266 (Billerica, MA)). Antes de cargar el sobrenadante, la resina se equilibró con 10 volúmenes de la columna de suero regulado con fosfato (PBS). En seguida del enlace de la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de la columna de suero regulado con fosfato (PBS), y entonces el anticuerpo se eluyó con 5 volúmenes de la columna de Glicina 0.1 M, pH de 2.0. Las fracciones de la columna se neutralizaron inmediatamente con 1/10 del volumen de Tris-HCl, pH de 9.0. Se midió la OD₂₈₀ de las fracciones, y las fracciones positivas se reservaron y se dializaron durante la noche contra suero regulado con fosfato (PBS), pH de 7.2.

Cinética de enlace y ensayo Biacore

La determinación de los parámetros cinéticos de enlace se hizo mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial utilizando el biosensor óptico Biacore S51. Esta tecnología permite hacer la determinación sin marca de las constantes microscópicas de

velocidad para el enlace (k_a), y de la disociación (k_d) de un ligando con un receptor. Por consiguiente, es especialmente adecuada para caracterizar las interacciones de anticuerpo-antígeno.

Los estudios de enlace de Pcsk9 con LFU720 (2 microgramos/
 5 mililitro) se llevaron a cabo mediante la captura del anticuerpo de ratón con un anticuerpo Fc γ de conejo anti-ratón (Biacore #BR-1005-14) que previamente se inmovilizó sobre un chip sensor Biacore Serie S CM-5 (certificado) (Biacore #BR-1005-30). El enlace covalente del anticuerpo de captura Fc γ se hizo con el "Kit de
 10 Acoplamiento de Amina" (Biacore #BR-1000-50). El anticuerpo de captura (de conejo anti-ratón) se unió a la superficie de dextrano activada por EDC con una solución de 50 microgramos/mililitro de anticuerpo anti-Fc γ en acetato de sodio 10 mM, pH de 5 (Biacore #BR-1003-51), a una velocidad de flujo de 10 microlitros/minuto. Un
 15 intervalo de concentraciones de Pcsk9 desde 0.5 μ M hasta 7.8 nM (dilución en serie doble) se hicieron fluir sobre el chip LFU720 capturado en suero regulado con fosfato más NaCl 100 mM, P20 al 0.005 por ciento (Biacore #BR-1000-54). Los sensogramas resultantes se analizaron utilizando el Software de Evaluación
 20 Biacore S51. Los datos a partir de todas las concentraciones se adaptaron globalmente a un modelo Langmuir 1:1.

Ensayo TR-FRET

El ensayo TR-FRET se llevó a cabo en placas superficiales blancas de 384 pozos (Perkin Elmer, 6008280). La hPcsk9-AF (10.7
 25 nM) se incubó con diluciones en serie de proteína hPcsk9 no

marcada, péptido de EGF-A, o anticuerpo NVP-LFU720-AX-1 durante
 30 minutos a temperatura ambiente en 15 microlitros de regulador de
 ensayo (HEPES 20 mM, pH de 7.2, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM,
 Tween 20 al 0.1 por ciento por volumen/volumen, y albúmina de
 5 suero bovino (BSA) al 0.1 por ciento en peso/volumen). Esto fue
 seguido por la adición de 5 microlitros de hLDL-R-Eu (4 nM) en
 regulador de ensayo a la hPcsk9 y complejo de NVP-LFU720-AX-1
 previamente incubado, y por incubación a temperatura ambiente
 durante 90 minutos. Las concentraciones finales de estas proteínas
 10 marcadas fueron 8 nM de hPcsk9-AF y 1 nM de hLDL-R-Eu. La señal
 TR-FRET se midió con el lector de múltiples marcas EnVision 2100
 (Perkin Elmer) a 330 nanómetros de excitación y a 665 nanómetros
 de emisión. Los datos se convirtieron a los valores normalizados
 utilizando la siguiente fórmula: $[(\text{valor de 665 nanómetros} \times 10,000) /$
 15 $(\text{valor de 615 nanómetros})]$. El porcentaje de inhibición se calculó
 con la siguiente fórmula: $100 - [(\text{valor normalizado de la muestra}$
 $\text{tratada} / \text{valor normalizado promediado de las muestras no tratadas})$
 $\times 100]$. Las curvas de respuesta a la dosis del porcentaje de
 inhibición se graficaron utilizando Prism versión 5 con la fórmula: $Y =$
 20 $\text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}))}$
 (Software GraphPad Prism).

Ensayo de movimiento del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R)

Las células HepG2 se tripsinizaron y se sembraron a 6×10^4
 25 células por pozo en 100 microlitros de medio de cultivo en placas de

96 pozos de fondo plano (Corning, 3595), las cuales se recubrieron previamente con colágeno al 1 por ciento por volumen/volumen), entonces se incubaron a 37°C en CO₂ al 5 por ciento durante 24 horas. En términos generales, las células se trataron con 100 microlitros de medio sin suero que contenía cualquiera de proteína hPcsk9, péptido de EGF-A, y/o anticuerpo NVP-LFU720-AX-1. Después del tratamiento, el medio se desechó, y las células se lavaron con 100 microlitros de suero regulado con fosfato (PBS). Para cosechar las células, se agregaron 100 microlitros de Versina (Biowhittaker, 17-771E), y se incubaron durante una hora a 37°C en CO₂ al 5 por ciento, seguido por la adición de 100 microlitros de regulador FACS. Las células se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo-V (Corning, 3894), y se centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto durante 5 minutos para aglomerar las células. Con el fin de bloquear los sitios de enlace no específico sobre las células, se agregaron 50 microlitros de 100 microgramos/mililitro de IgG de conejo normal (MP Biomedicals, 55944), e IgG de ratón (Sigma, I5381) en regulador FACS a cada pozo, y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto durante 5 minutos, y el regulador se removió fluctuando la placa. Para marcar las células, se agregaron a cada pozo 10 microlitros de IgG de conejo anti-hLDL-R-Alexa 647 (5 microgramos/mililitro), y 10 microlitros de anticuerpos marcados con IgG de ratón anti-transferrina-R-ficoeritrina (PE) (2 microgramos/mililitro) (CD71, Becton Dickinson Biosciences, 624048) en regulador FACS, y se

incubaron durante 60 minutos en hielo. Las células se centrifugaron a 1200 revoluciones por minuto durante 5 minutos, y el regulador se removi6 fluctuando la placa. Los anticuerpos no enlazados se removieron mediante el lavado de las células dos veces con 200 microlitros por pozo de regulador FACS. Las células se fijaron en paraformaldehído al 1 por ciento en suero regulado con fosfato, y las células viables se pasaron en compuerta (5000), y se analizaron utilizando un cit6metro de flujo BD LSR II y el software FACSDIVA (Becton Dickinson). El valor medio de la fluorescencia PE se midi6 a una excitaci6n de 488 nan6metros y a una emisi6n de 575 nan6metros. El valor medio de la fluorescencia Alexa 647 se midi6 a una excitaci6n de 488 nan6metros y a una emisi6n de 633 nan6metros. Una IgG policlonal de conejo anti-hLDL-R 583 hecha a la medida fue producida por Covance (Denver, PA, EUA) para la detecci6n FACS del hLDL-R superficial en células HepG2. La IgG de conejo anti-hLDL-R 583 exhibi6 una ventana de aproximadamente 7 veces para la detecci6n del hLDL-R sobre la superficie de las células HepG2, comparándose con la IgG de conejo normal. Para determinar la especificidad de la IgG anti-hLDL-R 583 por el LDL-R sobre la superficie de las células HepG2, se llev6 a cabo un experimento utilizando la proteína hLDL-R como un competidor por el enlace de esta IgG. Se observ6 una disminuci6n dependiente de la dosis en la fluorescencia media promedio para la IgG anti-hLDL-R 583 hacia las células HepG2 con las concentraciones crecientes de proteína hLDL-R. Esto demostr6 que la IgG anti-hLDL-R 583 reconoce

específicamente el LDL-R sobre la superficie de las células HepG2 como se mide mediante FACS. El trabajo futuro utilizó la IgG anti-hLDL-R-583-Alexa 647 directamente marcada para la cuantificación FACS del LDL-R sobre la superficie de las células HepG2.

5 **Absorción de LDL-C**

Las células HepG2 se tripsinizaron y se sembraron a 6×10^4 células por pozo en 100 microlitros del medio de cultivo en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, 3595, las cuales fueron previamente recubiertas con colágeno al 1 por ciento por volumen/volumen), entonces se incubaron a 37°C en CO₂ al 5 por ciento durante 24 horas. A menos que se informe de otra manera, las células se trataron con 100 microlitros de medio sin suero que contenía cualquiera de la proteína hPcsk9, el péptido EGF-A, y/o el anticuerpo NVP-LFU720-AX-1. Después del tratamiento, cada pozo recibió 20 microlitros de 30 microgramos/mililitro de lipoproteína de baja densidad marcada con 3,3'-dioctadecil-indocarbocianina (Dil-LDL) (Intracell, RP-077-175) en el medio sin suero, y se incubó a 37°C en CO₂ al 5 por ciento durante 2 horas. El medio se removió mediante la fluctuación de las placas, y las células se lavaron con 100 microlitros de suero regulado con fosfato (PBS sin calcio o magnesio, Invitrogen, 14190-144). El suero regulado con fosfato se removió fluctuando las placas, y se agregaron 100 microlitros de tripsina-EDTA al 0.25 por ciento a cada pozo, y se incubaron durante 5 minutos a 37°C en CO₂ al 5 por ciento. A cada pozo se le agregaron 100 microlitros de regulador FACS (PBS conteniendo

suero bovino fetal (FBS) al 5 por ciento, EDTA 2 mM, y azida de sodio al 0.2 por ciento), y las células se aglomeraron mediante centrifugación a 1200 revoluciones por minuto durante 5 minutos. El medio se desechó mediante la fluctuación de la placa, y las células se fijaron mediante la adición de 50 microlitros de paraformaldehído al 1 por ciento (Electron Microscopy Sciences, 15710) en suero regulado con fosfato por pozo. Las células viables se pasaron en compuerta y se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD LSR II y el software FACSDIVA (Becton Dickinson). El valor promedio de la fluorescencia de Dil-LDL a una excitación de 488 nanómetros y a una emisión de 575 nanómetros, y se analizaron 5000 células. Se generaron gráficas de barras utilizando Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation). El porcentaje de activación se calculó como sigue: % de Activación = $[1 - (X \div A)] \times 100$, en donde X = lectura de fluorescencia del medio a partir del pozo de muestra, y A = lectura de fluorescencia del medio a partir del pozo con solamente el tratamiento de hPcsk9.

Se graficó el porcentaje de activación contra el tratamiento para determinar las EC_{50} s a partir de las curvas de respuesta a la dosis generadas utilizando la ecuación: $Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) \times \text{HillSlope}))}$, y GraphPad Prism 5 (Software GraphPad).

Resultados

Generación de un anticuerpo monoclonal humano anti-PCSK9

Las células-B se cosecharon a partir de los ganglios linfáticos

primarios de animales inmunizados con la proteína Pcsk9. Los hibridomas se generaron utilizando la fusión mediada por PEG estándar. La fusión resultante se ensayó mediante ELISA, y se identificaron los aglutinantes positivos para la PCSK9 humana, y se expandieron para generar los sobrenadantes. Hubo múltiples clones positivos para el ELISA identificados que subsiguientemente se triañearon mediante ensayos funcionales. El clon que se identificó como el candidato principal es el LFU720. En adición a nuestro candidato principal, LFU720, se identificaron otros múltiples clones que fracasaron para bloquear la interacción de Pcsk9 y LDL-R (medida mediante FRET), y no obstante, cuando se enlazaron a Pcsk9 fueron capaces de bloquear la capacidad de Pcsk9 para mediar la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) (medida por la recuperación de LDL-C), incluyendo los clones 21D6, 5A4-C1, y 13F1. El clon 21D6 también mostró la capacidad para bloquear la degradación del LDL-R mediante la Pcsk9 *in vivo*.

Rastreo de LFU720 para determinar su enlace específicamente a Pcsk9

Se examinó la especificidad de LFU720 mediante la evaluación de su enlace con una serie de otras proteínas en un ELISA. El enlace de LFU720 a otras tres proteínas marcadas con HIS se comparó con el enlace a Pcsk9-HIS. Esto demostró que el enlace a Pcsk9 es específico, y que el anticuerpo no se estaba enlazando a la marca HIS.

Evaluación de LFU720 para enlazarse a la Pcsk9 de cinomolgo

Se determinó el enlace de LFU720 al homólogo de Pcsk9 de cinomolgo. Para este ensayo, los sobrenadantes a partir de las células que expresaban la Pcsk9 marcada con HIS de cinomolgo se utilizaron junto con una placa de captura de Ni, evitando la necesidad de purificar el material. La PCSK9 humana se diluyó y también se capturó por medio de su marca HIS. LFU720 fue capaz de enlazarse tanto a la Pcsk9 humana como de cinomolgo. 5P20 tampoco se enlazó al LDL-R humano ni a la Pcsk9 de ratón en el ELISA.

Cinética de enlace de LFU720

El anticuerpo de ratón LFU720, que reconoce la proteína PCSK9 humana, se analizó para determinar su afinidad de enlace empleando una técnica de biosensor óptico (Biacore). Se encontró que LFU720 se enlaza con una alta afinidad a la PCSK9 humana recombinante con una afinidad sub-nanomolar ($KD = 200$ pM).

Rastreo de LFU720 para determinar su bloqueo de la interacción de Pcsk9/LDL-R

Se utilizó el ensayo TR-FRET para determinar si el anticuerpo NVP-LFU720 anti-hPcsk9 podría interrumpir la interacción entre las proteínas marcadas hPcsk9-AF y hLDL-R-Eu. Se evaluó la proteína hPcsk9 no marcada o el péptido EGF-A para demostrar si el ensayo podría detectar la interrupción de la señal TR-FRET generada por la interacción de las proteínas marcadas hLDL-R-Eu y hPcsk9-AF. Las concentraciones crecientes de hPcsk9 no marcada compitieron con

hPcsk9-AF por el enlace a hLDL-R-Eu, lo cual dio como resultado una disminución de la señal TR-FRET. El péptido EGF-A interrumpió la interacción entre hLDL-R-Eu y hPcsk9-AF con una IC_{50} de 2.5 μ M. Inversamente, NVP-LFU720 interrumpió pobremente la señal TR-FRET entre hPcsk9-Eu y hLDL-R-AF con una IC_{50} mayor de 1000 nM, y exhibió una respuesta en forma de U en bajas concentraciones de anticuerpo.

Rastreo de LFU720 para determinar su inhibición de la degradación del LDL-R mediada por Pcsk9

Se ha demostrado que el enlace de Pcsk9 al LDL-R conduce a la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R), y esto se confirmó utilizando células HepG2 y la PCSK9 humana recombinante. Se determinó la capacidad de LFU720 para enlazarse a Pcsk9 y bloquear este efecto. NVP-LFU720 inhibió las células HepG2 tratadas con hPcsk9 exógena, y condujo a un aumento del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) de la superficie celular.

Rastreo de LFU720 determinar su inhibición de Pcsk9 y restablecer la absorción de LDL

La inhibición de la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) mediante la Pcsk9 debe restablecer la capacidad de las células HepG2 para internalizar el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C). NVP-LFU720 previno la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) mediada por la Pcsk9 en las células HepG2 tratadas con la hPcsk9

exógena, y condujo a un aumento en la absorción de Dil-LDL con una EC_{50} de 99 nM.

Ejemplo 2: Creación de los Anticuerpos Antagonistas de PCSK9: NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211

5 ***Introducción***

Este ejemplo describe la generación de los anticuerpos humanos NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 mediante el diseño del anticuerpo monoclonal de murino antagonista de PCSK9: NVP-LFU720, para tener una mayor homología de secuencia con el
10 anticuerpo de la línea germinal humana. NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 retienen la especificidad del epítipo, la afinidad, y la reactividad cruzada de PCSK9 de macaco cinomolgo del anticuerpo de murino progenitor. NVP-LFU720. NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP LGT211 tienen una homología mucho más alta con la secuencia
15 de la línea germinal humana que con el anticuerpo de murino original y, por consiguiente, deben ser mejor tolerados por el sistema inmunitario humano.

El anticuerpo monoclonal de ratón LFU720 se humano-diseñó (Humaneered^{MR}) para poner su secuencia de proteína más cerca de
20 una secuencia de la línea germinal humana, y disminuir su inmunogenicidad. La tecnología Humaneering^{MR} (de humano-diseño) está disponible a través de KaloBios del Sur de San Francisco (en la web mundial, en kalobios.com). La humano-ingeniería (Humaneering^{MR}) de anticuerpos genera anticuerpos humanos
25 diseñados con secuencias de la región-V que tienen una alta

homología con la secuencia de la línea germinal humana, mientras que todavía se conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo progenitor o de referencia (Publicaciones de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 2005/0255552 y 2006/0134098). El

5 proceso identifica primero los determinantes de especificidad de enlace de antígeno mínimos (BSDs) en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un Fab de referencia (típicamente, las secuencias dentro de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada y de la cadena ligera CDR3). Debido a

10 que estos determinantes de especificidad de enlace (BSDs) de la cadena pesada y ligera se mantienen en todas las bibliotecas construidas durante el proceso de humano-ingeniería (Humaneering^{MR}), cada biblioteca se enfoca al epítipo, y los anticuerpos humano-diseñados (Humaneered^{MR}) retienen la

15 especificidad del epítipo del anticuerpo de ratón original.

En seguida, se generan las bibliotecas de cadena completa (en donde una región variable de cadena ligera o pesada entera es reemplazada con una biblioteca de secuencias humanas) y/o las bibliotecas de casete (en donde una porción de la región variable de

20 cadena pesada o ligera del Fab de ratón es reemplazada con una biblioteca de secuencias humanas). Se utiliza un sistema de secreción bacteriana para expresar los miembros de la biblioteca como fragmentos de anticuerpos Fab, y se rastrea la biblioteca para buscar los Fabs que se enlacen al antígeno, utilizando un ensayo de

25 enlace de levantamiento de colonias (CLBA). Los clones positivos se

caracterizan adicionalmente para identificar aquéllos con la más alta afinidad. Los casetes humanos identificados que soporten el enlace en el contexto de las secuencias de murino residuales, se combinan entonces en un rastreo final de la biblioteca, para generar regiones-V
5 completamente humanas.

Los Fabs Humaneered^{MR} (humano-diseñados) resultantes tienen secuencias del segmento-V derivadas a partir de las bibliotecas humanas, retienen las secuencias cortas del determinante de especificidad de enlace (BSD) identificadas dentro de la región
10 determinante de complementariedad 3 (CDR3), y tienen las regiones de Estructura 4 de la línea germinal humana. Estos Fabs se convierten hasta las IgGs completas mediante la clonación de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras en los vectores de expresión de IgG. Los anticuerpos completamente Humaneered^{MR}
15 (humano-diseñados) generados en este proceso retienen la especificidad de enlace del anticuerpo de murino progenitor, típicamente tienen una afinidad por el antígeno equivalente o más alta que el anticuerpo progenitor, y tienen regiones-V con un alto grado de identidad de secuencia, comparándose con los genes de los
20 anticuerpos de la línea germinal humana al nivel de la proteína.

Métodos

Clonación de las regiones-V de murino

El ADN de la región-V a partir del NVP-LFU720 monoclonal de murino se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa
25 con transcripción inversa (RT-PCR) a partir del ARN aislado a partir

de la línea celular de hibridoma empleando los métodos convencionales. Los cebadores utilizados con éxito para la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable de cadena pesada a partir del ADNc del hibridoma fueron: V_H14 (5'-CTTCCTGATGGCAGTGGTT-3'; SEQ ID NO: 58) (Chardes T y colaboradores 1999, *FEBS Letters*; 452(3): 386-94), y HCconstante (5'-GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGG RRCCAGTGGATAGAC-3'; SEQ ID NO: 59). Los cebadores utilizados con éxito para la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable de la cadena ligera (kappa) a partir del ADNc del hibridoma fueron V_k4/5 (5'-TCAGCTTCYT GCTAATCAGTG-3'; SEQ ID NO: 60) (Chardes T y colaboradores, 1999, *supra*), y LCconstante (5'-GCGTCTAGAAGTGGATGGTG GGAAGATGG-3'; SEQ ID NO: 61). Las regiones variables de cadena pesada y ligera amplificadas se secuenciaron. Entonces se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los genes-V, y para incorporar los sitios de enzimas de restricción para la clonación dentro de los vectores KaloBios: V_H dentro de KB1292-His (versión modificada de KB1292 que codifica un enlazador flexible C-terminal y la marca 6-His (SEQ ID NO: 57) de la secuencia de aminoácidos AAGASHHHHHH (SEQ ID NO: 62) sobre CH1) en *Nco*I (5') y *Nhe*I (3'); V_k dentro de KB1296 en *Nco*I (5') y *Bsi*WI (3'). Estos vectores de cadena pesada y ligera separados se combinaron entonces en un solo vector de expresión de Fab KaloBios dicistrónico mediante digestión de restricción con *Bss*HII y *Cla*I, y ligamiento. Los

fragmentos Fab se expresaron en *E. coli* a partir de este vector. Este Fab se probó para determinar el enlace de PCSK9-antígeno y es referido como el Fab SR032 de referencia.

Purificación del Fab

5 Los fragmentos Fab se expresaron mediante secreción a partir de *E. coli* utilizando los vectores de expresión KaloBios. Las células se cultivaron en un medio 2xYT hasta una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.6. La expresión se indujo mediante la adición de IPTG hasta 100 µM, y agitación durante 4 horas a 33°C. El Fab
10 ensamblado se obtuvo a partir de las fracciones periplásmicas mediante lisis osmótica y purificación mediante cromatografía por afinidad utilizando columnas de Ni-NTA (columnas HisTrap HP; GE Healthcare Catálogo #17-5247-01) de acuerdo con los métodos convencionales. Los Fabs se eluyeron en regulador conteniendo
15 imidazol 500 mM, y se dializaron completamente contra suero regulado con fosfato, pH de 7.4, sin calcio ni magnesio.

Construcción de la biblioteca

Para el primer paso en la construcción de la biblioteca, se generaron bibliotecas de la región-V humana completa enfocada al
20 epítipo mediante amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las secuencias del segmento-V humano KaloBios. En la elaboración de estas bibliotecas de cadena completa, las regiones CDR3-FR4 únicas que contenían el determinante de especificidad de enlace (BSD) y las secuencias del segmento-J de la
25 línea germinal humana a partir del Fab SR038 de referencia

optimizado, se unieron a las bibliotecas del segmento-V humano utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) traslapada. Estas bibliotecas de la región-V completa no se rastrearon directamente, sino que más bien, se utilizaron como plantillas para la construcción de las bibliotecas medias Vh y Vk. Las bibliotecas del segmento-V humano KaloBios utilizadas para la construcción de la biblioteca de cadena completa se seleccionaron basándose en la secuencia de la línea germinal humana más cercana a las Vh y Vk de murino originales en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs). La Vh de NVP-LFU720 de murino original está más cerca de la secuencia de la línea germinal humana Vh1-02 en sus regiones determinantes de complementariedad (CDRs), de tal manera que se utilizó una mezcla de las dos bibliotecas KaloBios que contenían los miembros del subgrupo Vh1 (KB1410 y KB1411), en la elaboración de la biblioteca de Vh completa. De la misma manera, debido a que la Vk de NVP-LFU720 es la más cercana a la secuencia de la línea germinal humana Vk3 L6 en sus regiones determinantes de complementariedad (CDRs), se utilizó una mezcla de las dos bibliotecas del segmento-V humano KaloBios que contenían los miembros del subgrupo Vk3 (KB1423 y KB1424) en la elaboración de la biblioteca de Vk completa. Estas bibliotecas de Vh y Vk de longitud completa se utilizaron entonces como plantillas para la construcción de las bibliotecas de casete, en donde solamente una parte del segmento-V de murino progenitor es reemplazada por una biblioteca de las secuencias humanas. Se

construyeron dos tipos de casetes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de puente: Los casetes del extremo frontal que contenían las secuencias humanas en las FR1, CDR1, y la primera parte de la FR2, se amplificaron a partir de la mezcla de bibliotecas de Vh1 (KB1410 y KB1411) o de la mezcla de bibliotecas de Vk3 (KB1423 y KB1424) descritas anteriormente, como una plantilla. Los casetes medios que contenían las secuencias humanas en la última parte de FR2, CDR2, y FR3 se amplificaron utilizando las bibliotecas de la región Vh o Vk humana completa descritas anteriormente, como plantillas. Los casetes de Vh tuvieron secuencias comunes traslapadas en FR2 en las posiciones de aminoácidos 45-49 (numeración de Kabat); los casetes de Vk tuvieron secuencias comunes traslapadas en FR2 en los residuos de aminoácidos 35-39 (numeración de Kabat). De esta manera, las bibliotecas del casete humano del extremo frontal y medio se construyeron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los isotipos humanos V-pesado 1 y V-kappa 3. Cada biblioteca del casete de Vh se clonó en el vector KB1292-His en *NcoI* (5') y *KpnI* (3'); cada biblioteca del casete de Vk se clonó en el vector KB1296-B (versión modificada del vector KaloBios KB1296, el cual tiene un sitio *HindIII* silencioso agregado en FR4) en *NcoI* (5') y *HindIII* (3'). Entonces las bibliotecas de los plásmidos Vh o Vk resultantes se combinaron con la cadena complementaria a partir del Fab SR038 de referencia optimizado (por ejemplo, la biblioteca del extremo frontal de Vh se combinó con el vector de Vk de referencia optimizado) mediante

digestión con *Bss*HII y *Cla*I, y el ligamiento subsiguiente para crear las bibliotecas de los vectores dicistrónicos que expresaron los Fabs completos.

ELISA General

5 Se utilizó el antígeno de PCSK9-His6 humano recombinante o de macaco cinomolgo para todos los ensayos ELISA. Típicamente, el antígeno de PCSK9-His6 diluido en suero regulado con fosfato a un pH de 7.4, se enlazó a una placa de microtitulación de 96 pozos a 300 nanogramos/pozo mediante incubación durante la noche a 4°C.

10 La placa se bloqueó con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 3 por ciento en suero regulado con fosfato (PBS) durante una hora a 37°C, y entonces se enjuagó una vez con PBST. Entonces a cada pozo se le agregó el medio celular inducido que contenía el Fab o el Fab purificado diluido (50 microlitros). Después

15 de una incubación de una hora a 37°C, la placa se enjuagó tres veces con PBST. A cada pozo se le agregó el conjugado de anti-cadena kappa humana-HRP (Sigma #A7164) diluido a 1:5000 en suero regulado con fosfato (PBS) (50 microlitros), y la placa se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó

20 tres veces con PBST, entonces se agregaron 100 microlitros de sustrato SureBlue TMB (KPL #52-00-03) a cada pozo, y la placa se incubó durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó a 650 nanómetros en un espectrofotómetro.

25 Para los ELISAs de especificidad sobre las IgGs humana y de

ratón purificadas, una placa de 384 pozos se recubrió con un panel de antígenos humanos o de ratón purificados a 88 nanogramos por pozo, y se incubó durante la noche a 4°C. La placa se bloqueó y se lavó como se describe anteriormente; entonces, a cada pozo se le

5 agregaron 22 microlitros de anticuerpo anti-PCSK9 de ratón o humano purificado diluido a 2 microgramos/mililitro en suero regulado con fosfato (PBS). La placa se incubó durante 1 hora a 37°C, y luego se lavó con PBST. El anticuerpo Fc anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Labs #115-035-071) o el anticuerpo anti-kappa

10 humana (Sigma #A7164) conjugado con HRP, se diluyó a 1:5000 en suero regulado con fosfato (PBS) (25 microlitros), y se agregó a cada pozo. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavó y se reveló como se describe anteriormente.

Ensayo de enlace de levantamiento de colonias (CLBA)

15 El rastreo de las bibliotecas de fragmentos Fab Humaneered^{MR} (humano-diseñados) se llevó a cabo esencialmente como se describe en (las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 2005/0255552 y 2006/0134098) utilizando

20 filtros de nitrocelulosa recubiertos con PCSK9-His6 a 6 microgramos/mililitro. Los Fabs enlazados al filtro recubierto con antígeno se detectaron utilizando un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma #A3813) diluido a 1:5000 en PBST, y las manchas se revelaron con el sustrato quimiluminiscente para fosfatasa alcalina DuoLux (Vector Laboratories #SK-6605).

25 Generación de PCSK9 recombinante biotinilada y mediciones de

afinidad

La PCSK9 con marcas C-terminales Avi (para la biotinilación dirigida al sitio) y His6 (SEQ ID NO: 57) (PCSK9-Avi-His6) se generó mediante la inserción de un sitio de restricción EcoRI entre el gen que codificaba la PCSK9 y la marca His6 (SEQ ID NO: 57) en el plásmido pRS5a/PCSK9; expresa los aminoácidos 31-692 de la PCSK9 Uniprot Acceso Q8NBP7 con una marca His6 C-terminal (SEQ ID NO: 57)). Los oligonucleótidos que codificaban la marca Avi (secuencia de aminoácidos: GGGLNDIFEAQKIEWHE; SEQ ID NO: 63), y flanqueados con colgaduras de EcoRI se fosforilaron con la cinasa de polinucleótido T4 (Invitrogen), se templaron, y subsiguientemente se ligaron en pRS5a/PCSK9 utilizando el sitio EcoRI recién insertado. Los clones que contenían la marca Avi se verificaron mediante análisis de secuencias. La expresión de PCSK9-Avi-His6 se llevó a cabo en el Sistema de Expresión 293 Freestyle (Invitrogen), y la proteína recombinante secretada se purificó utilizando la resina de Ni-NTA (QIAGEN). En seguida de la purificación, la proteína PCSK9-Avi-His6 se dializó contra Tris 10 mM, pH de 8.0, NaCl 50 mM. La proteína se biotiniló *in vitro* con la ligasa de proteína-biotina (Avidex) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Al completarse, la reacción se dializó contra suero regulado con fosfato (PBS), pH de 7.2, y la biotinilación se verificó mediante Western blot, sondeando con estreptavidina conjugada con HRP.

La cinética de enlace de las IgGs y los fragmentos Fab se

analizó utilizando un ensayo de Titulación en Equilibrio en Solución (“SET”). Dicho de una manera breve, se agregaron diluciones en serie de hPCSK9 a la IgG o al Fab 60 pM, y se incubaron durante la noche. Una placa de microtitulación de Enlace Estándar (Meso Scale Discovery) se recubrió con 1 microgramo/mililitro de hPCSK9, y se incubó durante la noche, se lavó con suero regulado con fosfato (PBS) / Tween 20 al 0.05 por ciento (peso/volumen), se bloqueó con suero regulado con fosfato (PBS) / albúmina de suero bovino (BSA) al 5 por ciento (peso/volumen), y se lavó nuevamente. La preparación de anticuerpo-antígeno se agregó a la placa de Enlace Estándar recubierta con PCSK9, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres pasos de lavado adicionales, se agregó el anticuerpo de detección de cabra anti-humano marcado con la Sulfo-Tab (R32AJ-5, Meso Scale Discovery), y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa tres veces, se agregó el Regulador de Lectura (Meso Scale Discovery), y se midieron las señales de electroquimiluminiscencia (ECL) mediante un Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Los datos de electroquimiluminiscencia (ECL) se procesaron con la adición de Excel XLfit 4.3.2 (ID Business Solutions) utilizando el modelo de ajuste aplicable para los anticuerpos descritos en Piehler y colaboradores (1997) *J Immunol Methods* 201: 189-206. Se observó el enlace de alta afinidad entre la PCSK9 humana y los anticuerpos LGT209, LGT210, y LGT211 en solución, con valores KD de 150 a 190 pM calculados para cada uno.

Producción y purificación de anticuerpos

Los anticuerpos NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 completamente Humaneered^{MR} (humano-diseñados) (IgG1 kappa silenciosa) se produjeron mediante la co-transfección de los vectores
 5 como sigue, en células 293 Freestyle utilizando el reactivo de transfección 293Fectin (Invitrogen #51-0031) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

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

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

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

El anticuerpo se purificó a partir de los sobrenadantes celulares 293 Freestyle utilizando una columna HiTrap Protein A HP de 5 mililitros (GE Healthcare #17-0403-03). El anticuerpo se eluyó utilizando el Regulador de Elución de IgG (Pierce #21004), y el
 15 regulador se intercambió en suero regulado con fosfato (PBS) mediante diálisis. La cromatografía de afinidad de proteína A se llevó a cabo en un sistema de cromatografía de líquidos AKTAFPLC (GE Healthcare).

Ensayo de competición de epítomos

20 Se ensayó la competición entre el anticuerpo de ratón original NVP-LFU720 y su derivado Humaneered^{MR} (humano-diseñado) NVP-LGT209 por el enlace del epítipo sobre PCSK9 utilizando el sistema ForteBio Octet QK y los Biosensores de Alto Enlace de estreptavidina recubiertos con la PCSK9-Avi-His6 biotinilada.
 25 Entonces se enlazaron tres anticuerpos diferentes para separar los

sensores recubiertos con PCSK9 hasta la saturación: LFU720 de ratón, LGT209 completamente humano, o el anticuerpo de control de ratón 7D16 (que se sabe que tiene un epítipo separado de aquél de LFU720). En seguida, todos los sensores se sumergieron en pozos
 5 que contenían el anticuerpo de ratón LFU720, para determinar si el primer anticuerpo podría bloquear el enlace de LFU720.

Resultados

Secuencias de aminoácidos de la región-V de murino y de referencia

10 Se secuenciaron los productos de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) a partir de células de hibridoma que expresaban NVP-LFU720, y esta secuencia se verificó en gran parte (95 por ciento o más) al nivel de la proteína utilizando un Espectrómetro de Masas ThermoElectron LTQ-Orbitrap. Entonces
 15 se clonaron las regiones variables de cadena pesada y ligera de LFU720 en los vectores KaloBios con el objeto de crear el Fab SR032 de referencia. El primer aminoácido de NVP-LFU720 Vk se tuvo que cambiar desde una glutamina (Q) hasta un ácido glutámico (E) para hacer posible la clonación en los vectores KaloBios para la
 20 generación del Fab SR032 de referencia; por consiguiente, El SR032 Vk tiene ácido glutámico en la primera posición de Vk. El Fab SR032 tuvo las regiones-V de murino intactas a partir del NVP-LFU720 fusionado con las regiones constantes humanas, y se purificó a partir de *E. coli*. En una prueba ELISA de dilución del enlace del antígeno
 25 de PCSK9-His6, el Fab de referencia SR032 clonado produjo curvas

de enlace que dependieron de la concentración del Fab.. En adición al Fab (SR032) de referencia, se construyó un Fab de referencia optimizado, el SR038. Varios residuos de aminoácidos de estructura del SR032 se cambiaron hasta la línea germinal humana en el
5 SR038.

Análisis de afinidad de Fb de referencia y de referencia optimizado

Los residuos de la línea germinal humana incorporados en el Fab SR038 de referencia optimizado en las FR1 y FR3 son aquéllos especificados por los cebadores de la reacción en cadena de la
10 polimerasa (PCR) utilizados para amplificar el repertorio del segmento-V humano y, por consiguiente, están presentes en todos los miembros de las bibliotecas de la región-V Humaneered^{MR} (humano-diseñada). El Fab de referencia optimizado se construyó para evaluar si cualquiera de los cambios a la línea germinal humana
15 altera o no las propiedades de enlace de Fab. Mediante el ELISA de dilución, utilizando los Fabs purificados, se determinó que las afinidades de SR032 y SR038 por el antígeno de PCSK9 recombinante eran idénticas, indicando que se toleran los cambios de aminoácidos en SR038.

20 Construcción de la biblioteca y selección de los Fabs completamente Humaneered^{MR} (humano-diseñados)

Se generaron bibliotecas de casete de extremo frontal y medio de cadena pesada y ligera restringidas al subgrupo para Vh1 o Vk3, y se rastrearon para buscar el CLBA. Para Vh, se identificaron los
25 casetes de extremo frontal que soportaban el enlace al antígeno de

PCSK9 mediante el ensayo de enlace de levantamiento de colonias, pero no los casetes medios de Vh. Para Vk, se identificaron ambos casetes de extremo frontal y medio mediante el levantamiento de colonias y, en adición, se identificaron algunos clones de Vk
5 completos (debido a la contaminación de la biblioteca de extremo frontal de Vk con clones Vk de cadena completa). Muchos enlazadores a partir de cada biblioteca se volvieron a confirmar en un ensayo ELISA sobre los sobrenadantes celulares que contenían el Fab, y se purificaron varios Fabs a partir de cada biblioteca, desde
10 las fracciones periplásmicas, y se ordenaron por clasificación de afinidad utilizando el análisis Forte.

Debido a que no se identificaron casetes medios pesados-V que soportaran el enlace de PCSK9, se construyeron dos bibliotecas mutagénicas que codificaban ya sea el residuo de murino progenitor
15 o bien el residuo de la línea germinal humana más cercano en todas las posiciones dentro las CDR2 o FR3 de la cadena pesada. Por consiguiente, se construyó una biblioteca de casete medio humano diseñado, se rastreó, y se identificaron los clones de enlace de antígeno. Entonces se combinaron los cambios a la línea germinal
20 humana en la Vh media que soportaron el enlace en el contexto de los clones individuales, para crear un casete medio final, y se confirmó el enlace de afinidad de un Fab que contenía este casete en el contexto del Fab de referencia optimizado, así como el Fab de referencia optimizado, mediante el análisis Forte.

25 A partir de las bibliotecas creadas, se identificaron con éxito

los casetes humanos de extremo frontal y medio que soportaron el enlace al antígeno de PCSK9, para ambas cadenas pesada y ligera, mediante CLBA. Estos enlazadores fueron todos confirmados mediante ELISA, y entonces los Fabs se purificaron y se ordenaron por clasificación utilizando el sistema ForteBio Octet. Los casetes de alta clasificación para las cadenas pesada y ligera se combinaron en una biblioteca final mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de puente, y se seleccionaron los Fabs completamente Humaneered^{MR} (humano-diseñados) que soportaron el enlace a PCSK9 a partir de esta biblioteca mediante CLBA. En paralelo con esto, se combinaron entre sí todos los casetes o cadenas de clasificación superior (la mejor Vh de extremo frontal, la Vh media diseñada, y la mejor cadena ligera completa), para crear un solo Fab SR066, que se predeciría que soportaría el enlace de alta afinidad.

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera para el mAb NVP-LFU720 de ratón progenitor y los Abs Humaneered^{MR} (humano-diseñados) NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211, se muestran in Figuras 1 a 4, respectivamente.

Prueba de la afinidad de los Fabs completamente Humaneered^{MR} (humano-diseñados) para el antígeno de PCSK9 utilizando el análisis ForteBio Octet

Se expresaron y se purificaron el Fab SR066 Humaneered^{MR} (humano-diseñado) y tres Fabs extraídos de la biblioteca de combinación final (#1-2, #3-2, y #4-2). Entonces se comparó la cinética de enlace de estos cuatro Fabs humanos con la cinética del

Fab SR038 de referencia optimizado, utilizando el sistema ForteBio Octet (los datos numéricos se resumen en la Tabla 1).

Tabla 1

Afinidad de Fabs completamente Humaneered^{MR} para PCSK9

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

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

La determinación de la concentración de proteína para estos Fabs fue difícil; como tales, los datos fuera de índice (kd) son mucho más confiables que los datos en índice (ka) y KD (solamente los fuera de índice son independientes de la concentración). Los cuatro Fabs Humaneered^{MR} (humano-diseñados) probados parecieron tener datos fuera de índice que fueron de 3 a 4 veces "peores" (es decir, más rápidos) que aquéllos del Fab de referencia optimizado. Esta disminución en la afinidad probablemente se debió a los extremos frontales de cadena pesada de estos clones, debido a que todos los

enlazadores de Fab seleccionados a partir de la biblioteca del casete de extremo frontal de cadena pesada original parecieron tener datos fuera de índice "peores" que el Fab de referencia optimizado (no se muestran los datos). Debido a que el extremo frontal de cadena pesada contiene la CDR1, los cambios hechos a esta CDR en los casetes de extremo frontal de Vh fueron una causa potencial para la disminución de afinidad de los Fabs Humaneered^{MR} (humano-diseñados) finales. De los Fabs completamente Humaneered^{MR} (humano-diseñados), el SR066 tuvo los mejores datos fuera de índice (Tabla 1), y hubo tres diferencias entre el SR066 y la secuencia de referencia (de ratón) en la CDR1 de cadena pesada. Para probar la idea de que los cambios hechos a la CDRH1 fueron responsables de la disminución en la afinidad que se vio en todos nuestros Fabs Humaneered^{MR} (humano-diseñados), cambiamos simultáneamente dos residuos a la vez en la CDRH1 del SR066 de regreso para concordar con los residuos de murino originales, y se expresaron y purificaron estos Fabs alterados para el análisis cinético Forte.

Un Fab con dos cambios simultáneos en la CDRH1 (SR079) (Tabla 2) mejoró de una manera significativa la cinética de enlace del SR066 (los datos numéricos se resumen en la Tabla 3). De hecho, el Fab SR079 pareció tener datos fuera de índice equivalentes a aquéllos del FAB SR038 de referencia optimizado (de ratón).

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

5	SR066 (Humaneered ^{MR} [humano-diseñado])	TYYMN	SEQ ID NO: 64
	SR038 (ratón)	DMYMS	SEQ ID NO: 65
10	SR079 (Humaneered ^{MR} [humano-diseñado])	TMYMS	SEQ ID NO: 66

* Los residuos humanos (derivados de SR066) o invariantes están en negrillas; los residuos de murino están en letra normal.

Tabla 3**Afinidad del Fab SR079 por la PCSK9**

15

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

20

25

Los Fabs Humaneered^{MR} (humano-diseñados) SR066, #1-2, #3-2, y #4-2, contuvieron una secuencia de aminoácidos “Asn-Gly” (“NG”) en la CDRH2, que llegó a partir del anticuerpo de ratón original. Se sabe que esta secuencia experimenta potencialmente desamidación, una propiedad indeseable para la producción. Por

consiguiente, al mismo tiempo en que se hicieron esfuerzos por mejorar la afinidad del Fab Humaneered^{MR} (humano-diseñado) SR066, se construyeron dos bibliotecas mutagénicas en el contexto del SR066, en donde "N" o "G" fueron sustituidos con cada aminoácido posible, excepto el aminoácido original (por ejemplo, en la "biblioteca de remoción de N", "N" fue sustituido con cada aminoácido excepto por "N"). Los sobrenadantes que contenían el Fab a partir de esta biblioteca se rastrearon entonces mediante un ELISA para identificar los clones que ya no tuvieron la secuencia "NG" pero todavía retuvieron el nivel de enlace del SR066 (el cual es menor que aquél del Fab SR038 de referencia optimizado). La "biblioteca de remoción de N" no proporcionó Fabs que se enlazaran hasta el mismo grado que el SR066, pero la "biblioteca de remoción de G" proporcionó Fabs con niveles de enlace suficientes que tuvieron un número de sustituciones diferentes en la posición "G". De éstos, se seleccionaron los Fabs que tuvieron cambios de "NG" a "NE," "NA," y "NM" para la purificación y el análisis cinético Forte, y se encontró que tenían una cinética similar a aquélla del Fab SR066 progenitor.

20 Diseño de la IgG humana 7472 para mejorar la afinidad

Diseño de Vk

Con el objeto de crear una IgG completamente humana, la secuencia Vh del SR079 (versión modificada del SR066 que tiene una mejor afinidad) hasta la CDRH2, se amplificó y se cosió a la secuencia de un clon de la "biblioteca de remoción de G" (que

contenía "NE" en la CDRH2) a partir de la CDRH2 hasta la mayor parte de la FR4, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de puente. Esta secuencia de Vh se clonó en pRS5a-hIgG1 LALA + KpnI (vector de clonación de IgG1 silenciosa que se había
5 modificado para agregar un sitio KpnI en FR4 sin afectar a la secuencia de aminoácidos de la Vh) en NruI (5') y KpnI (3') para crear el pSR074. La Vk (a partir de FR1 a la mitad del camino hasta la FR4) a partir del SR066, se amplificó y se clonó en pRS5a-hkappa en AgeI y BsiWI para crear el pSR072. Estos vectores se verificaron
10 mediante secuenciación, y se co-transfectaron en las células 293 Freestyle. Esta IgG (referida como "7472") se purificó a partir del medio celular que contenía el anticuerpo. De una manera sorprendente, el anticuerpo 7472 tuvo datos en el índice significativamente más lentos que el anticuerpo de ratón progenitor
15 LFU720 de acuerdo con el análisis Biacore (no mostrado). Mediante el intercambio de cada cadena humana con la cadena de ratón progenitora complementaria, se determinó que este defecto en el índice se debe a un problema con la cadena ligera humana. Se hicieron alteraciones a la cadena ligera humana del pSR072 para
20 rescatar la afinidad (Tabla 4): los primeros cuatro residuos de la cadena ligera se convirtieron de regreso a la secuencia de ratón, y los residuos de la segunda mitad de la CDR1 se convirtieron de regreso a los de ratón. Esta cadena ligera se clonó en pRS5a-hkappa como se describe anteriormente para generar los pJG10 y pJG01, y se
25 generó una IgG completa mediante la co-transfección de los pSR074

(vector Hc) y pJG10 (vector Lc) o pJG01 (vector Lc). Juntos, estos cambios rescataron parcialmente la afinidad del anticuerpo Humaneered^{MR} (humano-diseñado) como se determinó mediante Biacore.

5

Tabla 4**Cambios hechos a la cadena ligera de IgG 7472**

10

<u>LC término-N (SEQ ID NO:)</u>		<u>LC CDR1 (SEQ ID NO:)</u>	
7472	EIVM (67)	7472	RASQSVSSSHVA (68)
LFU720	QIVL (69)	LFU720	SASSSVS--YMH (70)
pJG10	QIVL (69)	pJG10	RASQSVS--YMH (71)

15

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

20

Maduración de afinidad de la CDRH3

25

En paralelo con las alteraciones de la cadena ligera, se construyó una biblioteca de Fab para madurar la afinidad de la CDR3 de la cadena pesada de pSR074. En esta biblioteca, los residuos de CDR3 fueron individualmente sustituidos con cada tercer aminoácido,

excluyendo el residuo original. Esta biblioteca se rastreó mediante CLBA, los enlazadores se verificaron mediante ELISA, y los Fabs resultantes se purificaron y se probaron mediante interferometría de la bio-capa, para determinar si tenían una mejor cinética de enlace en relación con el Fab humano progenitor.

Se identificó una sustitución de la CDRH3 que mejoró de una manera significativa la afinidad: un cambio de A a N (Tabla 5). Este cambio se hizo subsiguientemente en el contexto del plásmido de expresión de la IgG de cadena pesada pSR074; esta nueva construcción se denominó como pJG04. El anticuerpo Humaneered^{MR} (humano-diseñado) final NVP-LGT209 (LGT209) se generó mediante la co-transfección de pJG04 (Hc) y pJG10, y la subsiguiente purificación. El anticuerpo Humaneered^{MR} (humano-diseñado) final NVP-LGT210 (LGT210) se generó mediante la co-transfección de pJG04 (Hc) y pJG01, y la subsiguiente purificación. Este cambio no se introdujo en el anticuerpo NVP-LGT211 (LGT211).

Tabla 5

Cambio hecho a la CDR3 de cadena pesada de la IgG 7472

<u>Secuencia de CDRH3</u>		<u>SEQ ID NO:</u>
7472	CARSYYYYAMDY	<u>72</u>
LFU720	CARSYYYYAMDY	<u>72</u>
pJG04	CARSYYYY<u>N</u>MDY	<u>73</u>

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

Análisis de la cinética de enlace de NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 utilizando el sistema de Titulación en Equilibrio en Solución (SET)

Utilizando en ensayo SET, se determinó que las afinidades de enlace de los anticuerpos NVP-LGT209, NVP-LGT210 y NVP-LGT211 con la PCSK9 humana fueron de entre 150 pM y 190 pM, como se indica en la Tabla 6. Esto sugiere una interacción de alta afinidad entre los anticuerpos y la PCSK9 en solución.

Tabla 6

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

Análisis de especificidad del antígeno de NVP-LGT209 mediante ELISA

Con el objeto de probar si se retenía la especificidad del

antígeno del anticuerpo de ratón progenitor LFU720 en las IgGs Humaneered^{MR} (humano-diseñadas) finales, LGT209, LGT210 y LGT211, se probó el enlace de los anticuerpos a un panel de antígenos humanos y de ratón (así como a la PCSK9 humana) en un ensayo ELISA. Los resultados de este ensayo (Figuras 5A-C) muestran que LGT209, LGT210 y LGT211 retienen la alta especificidad por la PCSK9, de una manera similar al anticuerpo de murino LFU720.

10 Enlace del anticuerpo a la proteína Pcsk9 humana y de macaco cinomolgo en el ELISA

LGT209, LGT210 y LGT211 se evaluaron para determinar su enlace específico a la Pcsk9 humana y de macaco cinomolgo (cino). Este ensayo ELISA muestra que, como el anticuerpo de ratón progenitor LFU720, los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) LGT209, LGT210 y LGT211 son capaces de enlazarse a la Pcsk9 tanto humana como de cinomolgo de una manera similar (Figuras 6A-C).

20 Ensayo de competición de epítipo basado en la interferometría de bio-capa

Con el objeto de probar si se retenía la especificidad con el epítipo del anticuerpo de murino progenitor NVP-LFU720 en los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) finales LGT209, LGT210 y LGT211, se desarrolló un ensayo de competición utilizando

el sistema ForteBio Octet. Los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) LGT209, LGT210 y LGT211 bloquean el enlace del anticuerpo de ratón progenitor NVP-LFU720, indicando que los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) retienen la especificidad con el epítipo del anticuerpo de murino original. Se obtuvieron resultados similares cuando se cambió el orden de carga de los anticuerpos, es decir, primero se enlazó el NVP-LFU720, seguido por el anticuerpo Humaneered^{MR} (humano-diseñado).

10 Secuencia de aminoácidos de los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) LGT209, LGT210 y LGT211 y porcentaje de identidad con la secuencia de la línea germinal humana

Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la IgG Humaneered^{MR} (humano-diseñada) final LGT209, LGT210 y LGT211 se muestran en las Figuras 2 a 4, respectivamente; las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) están subrayadas y en negrillas. Se incluyen las secuencias de nucleótidos en el listado de secuencias.

Se determinó el porcentaje de identidad con las secuencias de la línea germinal humana para los anticuerpos LGT209, LGT210 y LGT211 mediante la alineación de las secuencias de aminoácidos de Vh y Vk contra una sola secuencia de la línea germinal humana (Vh1 1-02 y Vk3 A27, respectivamente; Tabla 7). Los residuos en CDRH3 y CDRL3 se omitieron del cálculo para cada cadena.

Tabla 7

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

5

Vh contra Vh1 1-02	Vk contra Vk3 A27
89 %	91 %

Se discute información adicional con respecto a la caracterización funcional de los anticuerpos Humaneered^{MR} (humano-diseñados) en las leyendas de las Figuras 8 a 14.

10

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

15

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

20

Con respecto a la CDR1 de cadena pesada, **TMYMS** (SEQ ID NO: 66), solamente los clones que contienen los residuos de ratón originales (en negrillas) retienen la cinética de enlace del anticuerpo de ratón (como se determina mediante el análisis de interferometría de bio-capa). Por consiguiente, estos residuos dentro de la CDR1 de cadena pesada tienen una función en el enlace.

25

Con respecto a la CDR2 de cadena pesada, **RIDPANEHTNYA** QKFQG (SEQ ID NO: 74), los residuos en negrillas no se alteraron en los enlazadores de anticuerpos extraídos de una biblioteca que

codificaba ya sea el residuo original (de ratón) o bien el residuo correspondiente de la secuencia de la línea germinal humana más cercana en cada posición (rastreada mediante ELISA). Por consiguiente, los residuos en negrillas tienen una función en el enlace. Se toleran sustituciones conservadoras en la posición indicada por el residuo Glu subrayado; por ejemplo, esta posición puede ser A, E o D, como se determina mediante ELISA, y como se confirma mediante interferometría de bio-cap.

Con respecto a la CDR3 de cadena pesada, **SY~~Y~~Y(A/N)MD~~Y~~** (SEQ ID NO: 75), los residuos en negrillas no se alteraron en los clones extraídos de la biblioteca de maduración de afinidad que codificaba todas las posibilidades de aminoácidos (excluyendo los aminoácidos originales) en cada posición. Por consiguiente, los residuos en negrillas tienen una función en el enlace. Se toleran sustituciones conservadoras en la posición indicada por el residuo Ala o Asn subrayado; por ejemplo, esta posición puede ser A, N o Q, como se determina mediante Biacore. Se toleran sustituciones conservadoras en la posición indicada por el residuo Tyr subrayado; por ejemplo, esta posición puede ser A, F, S, V o Y, como se determina mediante Biacore.

Con respecto a la FR1 de cadena ligera, (~~E~~/~~Q~~)IV(~~M~~/~~L~~)TQ SPATLSVSPGERATLSC (SEQ ID NO: 76), se toleran sustituciones conservadoras en las posiciones subrayadas 1 y 4, como se determina mediante Biacore. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 1 puede ser A, D, E, N o Q. El aminoácido en la posición 4

puede ser V, I, L o M. Las posiciones 1 a 4 como QIVL (SEQ ID NO: 69) (como en el LFU720 progenitor de ratón, LGT209 y LGT211 Vk) tienen un mejor enlace sobre las posiciones 1 a 4 como EIVM (SEQ ID NO: 67) (como en LGT210 Vk), como se determina mediante

5 Biacore.

Con respecto a la CDR1 de cadena ligera, RASQSVSYM^H (SEQ ID NO: 71), el espaciamiento de los residuos en negrillas tuvo consecuencias para el enlace, debido a que se comprometió la afinidad de un clon humano con 2 aminoácidos extra en esta porción

10 de la CDR1 de Lc. Por consiguiente, los residuos en negrillas tienen una función en el enlace.

Con respecto a la CDR3 de cadena ligera, LQWSSDPPT (SEQ ID NO: 26), no se toleran cambios a la línea germinal humana en estas posiciones, como se determina mediante ELISA. Por

15 consiguiente, los residuos en negrillas tienen una función en el enlace.

Se entiende que los Ejemplos y modalidades descritos en la presente son para propósitos ilustrativos solamente, y que se sugerirán diferentes modificaciones o cambios a la luz de los mismos

20 para las personas expertas en este campo, y se deben incluir dentro del espíritu y alcance de esta solicitud, y dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente, y entradas de acceso de secuencias citadas en la presente, se incorporan a la presente como referencia en su

25 totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se enlaza a la pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9 (PCSK9), en donde el anticuerpo:

a) no bloquea el enlace de PCSK9 al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), y

b) inhibe la degradación del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) mediada por la PCSK9.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a cuando menos un aminoácido dentro de las posiciones de los residuos 680-692 de la PCSK9 humana.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a la PCSK9 humana con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de aproximadamente 500 pM o menos.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo tiene una vida media *in vivo* de cuando menos 7 días.

5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende un segmento-V de cadena pesada humano, una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende un segmento-V de cadena ligera humano, una región

determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera, y una región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera, en donde

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos SYYYY(A/N)MD(A/F/S/V/Y) (SEQ ID NO: 14); y

ii) la región variable de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos LQWSSDPPT (SEQ ID NO: 26).

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el segmento-V de la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28, y en donde el segmento-V de la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

7. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el segmento-V de la cadena pesada tiene cuando menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27, y en donde el segmento-V de la cadena ligera tiene cuando menos el 85 por ciento de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.

8. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde:

i) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; y

ii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

5 9. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada es una región de estructura 4 (FR4) de la línea germinal humana.

10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde la región de estructura 4 (FR4) de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 35.

10 11. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera es una región de estructura 4 (FR4) de la línea germinal humana.

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en donde la región de estructura 4 (FR4) de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 39.

15 13. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el segmento-V de la cadena pesada y el segmento-V de la cadena ligera, cada una comprenden una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), y una región determinante de complementariedad 2 (CDR2); en donde:

20 i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;

25 iii) la región determinante de complementariedad 1

(CDR1) del segmento-V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22; y

iv) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25.

14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 7;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena pesada comprende la SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) del segmento-V de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 21;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) del segmento-V de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 24; y

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena ligera comprende la SEQ ID NO: 26.

15. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región

variable de cadena pesada tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la SEQ ID NO: 40, y la región variable de cadena ligera tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la SEQ ID NO: 41.

16. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada tiene cuando menos el 95 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la SEQ ID NO: 40, y la región variable de cadena ligera tiene cuando menos el 95 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable de la SEQ ID NO: 41.

17. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 40, y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 41.

18. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y la región variable de cadena ligera tiene cuando menos el 90 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18.

19. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada tiene cuando menos el 95 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable

seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y la región variable de cadena ligera tiene cuando menos el 95 por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos con la región variable seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18.

20. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18.

21. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un fragmento Fab'.

22. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es una IgG.

23. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de una sola cadena (scFv).

24. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende regiones constantes humanas.

25. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se enlaza a una proteína portadora.

26. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está PEGilado.

27. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a la PCSK9, en donde el anticuerpo comprende una región variable de

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

5 en donde:

i) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;

10 ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

15 iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la
20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

28. El anticuerpo de la reivindicación 27, en donde:

25 i) la región determinante de complementariedad 1

(CDR1) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7;

ii) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10;

iii) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13;

iv) la región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21;

v) la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24;

vi) la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

29. Una composición que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1, y un excipiente fisiológicamente compatible.

30. La composición de la reivindicación 29, en donde la

composición comprende además un segundo agente que reduce los niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en un individuo.

31. La composición de la reivindicación 30, en donde el
5 segundo agente es una estatina.

32. La composición de la reivindicación 31, en donde la estatina se selecciona a partir del grupo que consiste en atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y simvastatina.

10 33. La composición de la reivindicación 30, en donde el segundo agente se selecciona a partir del grupo que consiste en fibratos, niacina y análogos de la misma, inhibidores de la absorción de colesterol, secuestrantes de ácido biliar, miméticos de hormona tiroides, un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos
15 microsomal, un inhibidor de acil-transferasa de diacil-glicerol (DGAT), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la apoB100.

34. Un método para reducir el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en un individuo que lo necesite,
20 comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la reivindicación 1 al individuo, reduciendo de esta manera el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) en el individuo.

35. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo
25 tiene hipo-respuesta o es resistente a la terapia con estatina.

36. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo es intolerante a la terapia con estatina.

37. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo tiene un nivel de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) de la línea base de cuando menos aproximadamente 100 miligramos/decilitro.

38. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo tiene hipercolesterolemia familiar.

39. El método de la reivindicación 34, en donde se reduce el colesterol total con el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C).

40. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo tiene trigliceridemia.

41. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo tiene una mutación del gen de PCSK9 de ganancia de función.

42. El método de la reivindicación 34, en donde el individuo tiene dislipidemia inducida por fármacos.

43. El método de la reivindicación 34, el cual además comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo agente efectivo para reducir el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C), al individuo.

44. El método de la reivindicación 43, en donde el segundo agente es una estatina.

45. El método de la reivindicación 44, en donde la estatina se selecciona a partir del grupo que consiste en atorvastatina,

cerivastatina, fluvastatina, lovastatina, mevastatina, pitavastatina, pravastatina, rosuvastatina, y simvastatina.

46. El método de la reivindicación 43, en donde el segundo agente se selecciona a partir del grupo que consiste en fibratos, niacina y análogos de la misma, inhibidores de la absorción de colesterol, secuestrantes de ácido biliar, miméticos de hormona tiroides, un inhibidor de proteína de transferencia de triglicéridos microsomal, un inhibidor de acil-transferasa de diacil-glicerol (DGAT), un ácido nucleico inhibidor dirigido a la PCSK9, y un ácido nucleico inhibidor dirigido a la apoB100.

47. El método de la reivindicación 43, en donde el anticuerpo y el segundo agente se co-administran como una mezcla.

48. El método de la reivindicación 43, en donde el anticuerpo y el segundo agente se co-administran por separado.

49. El método de la reivindicación 34, en donde el anticuerpo se administra intravenosamente.

50. El método de la reivindicación 34, en donde el anticuerpo se administra subcutáneamente.

RESUMEN

La presente invención proporciona antagonistas de anticuerpos
contra la pro-proteína convertasa-subtilisina/quexina tipo 9a
5 (“PCSK9”), y métodos para utilizar estos anticuerpos.

* * * * *

10

15

20

25

FIG. 1

Secuencias de región variable del anticuerpo monoclonal de ratón progenitor LFU720

Región Variable de Cadena Pesada LFU720

EVQLQQSGAELMKPGASVKLSCTASGFNIKDMYMSWVRQRPEQGLEWIGRIDPANGH
TNYDPKFQAKATITTTDTSSKTAYLHLSSLTSED^{AVYYCAR}SYYYAMDYWGQGTSVT
VSS

Región Variable de Cadena Ligera (kappa) LFU720

QIVLTQSPA^{IM}ASPGEKVTMTCSSASSVSYMHWYQQKPGSSPRLWIYLTFNLA
SGVPARFSGSGSGTSYSLSISSMEAEDAATYYCLQWSSDPPTFGSGTKLEIK

FIG. 2

Secuencias de región variable del anticuerpo NVP-LGT209

pJG04 (Vh) +pJG10 (Vk)

pJG04 Vh

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPANE
HTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARSYYYYNMDYWGQGT
LVTVSS

pJG10 Vk

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFERRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLQWSSDPPTFGQGTKLEIK

FIG. 3

Secuencias de región variable del anticuerpo NVP-LGT210

pJG04 (Vh) +pJG01 (Vk)

pJG04 Vh

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGRIDPANE
HTNYAQKFOGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARSYYYYNMDYWGQGT
LVTVSS

pJG01 Vk

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFERRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLQWSSDPPTFGQGTKLEIK

FIG. 4

Secuencias de región variable del anticuerpo NVP-LGT211

pSR74 (Vh) +pJG10 (Vk)

pSR074 Vh

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTMYMSWVRQAPGQGLEWMGGRIDPANE
HTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCARSYYYAMDYWGQGT
LVTVSS

pJG10 Vk

QIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYGVFERRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTIGRLEPEDFAVYYCLQWSSDPPTFGQGTKLEIK

FIG. 5A

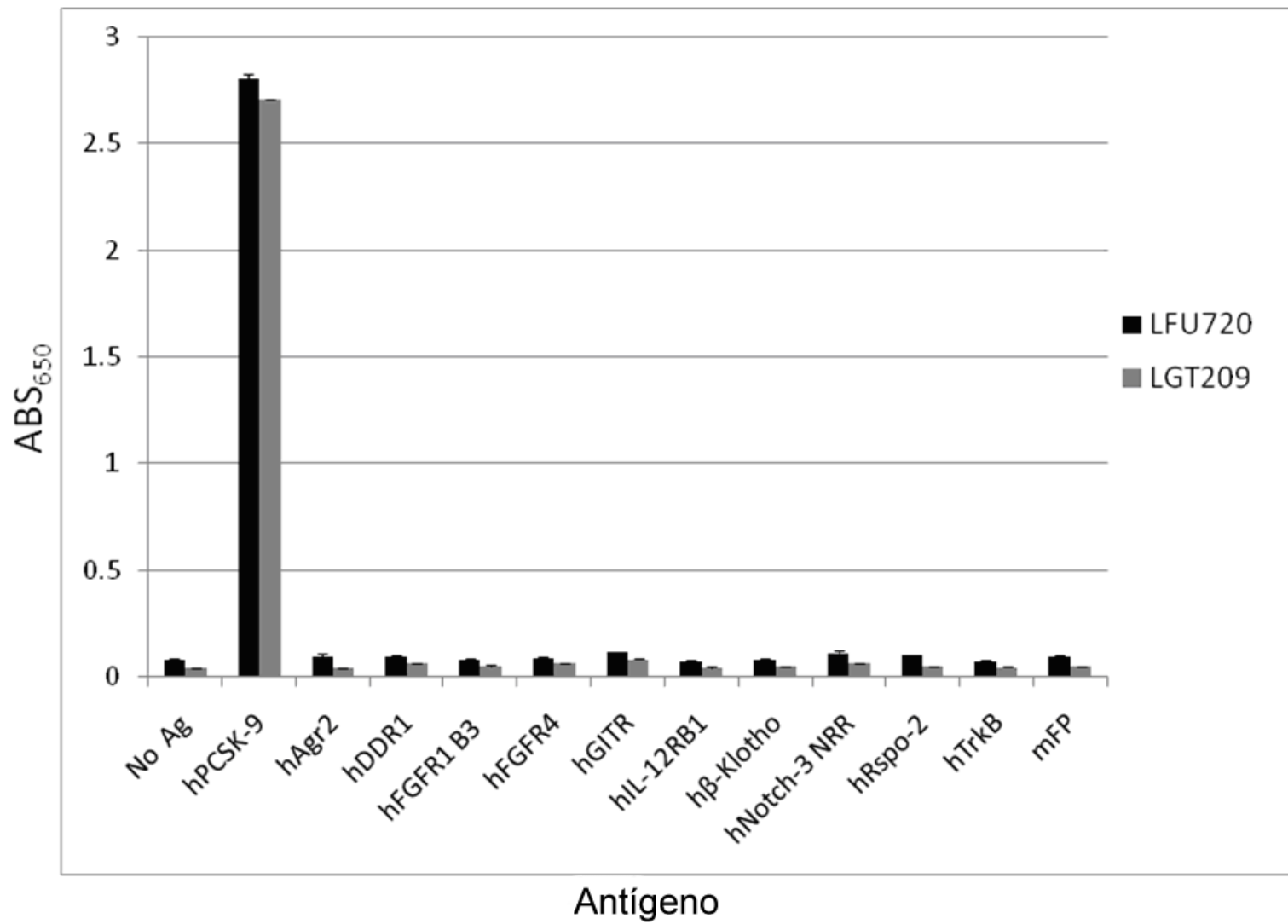


FIG. 5B

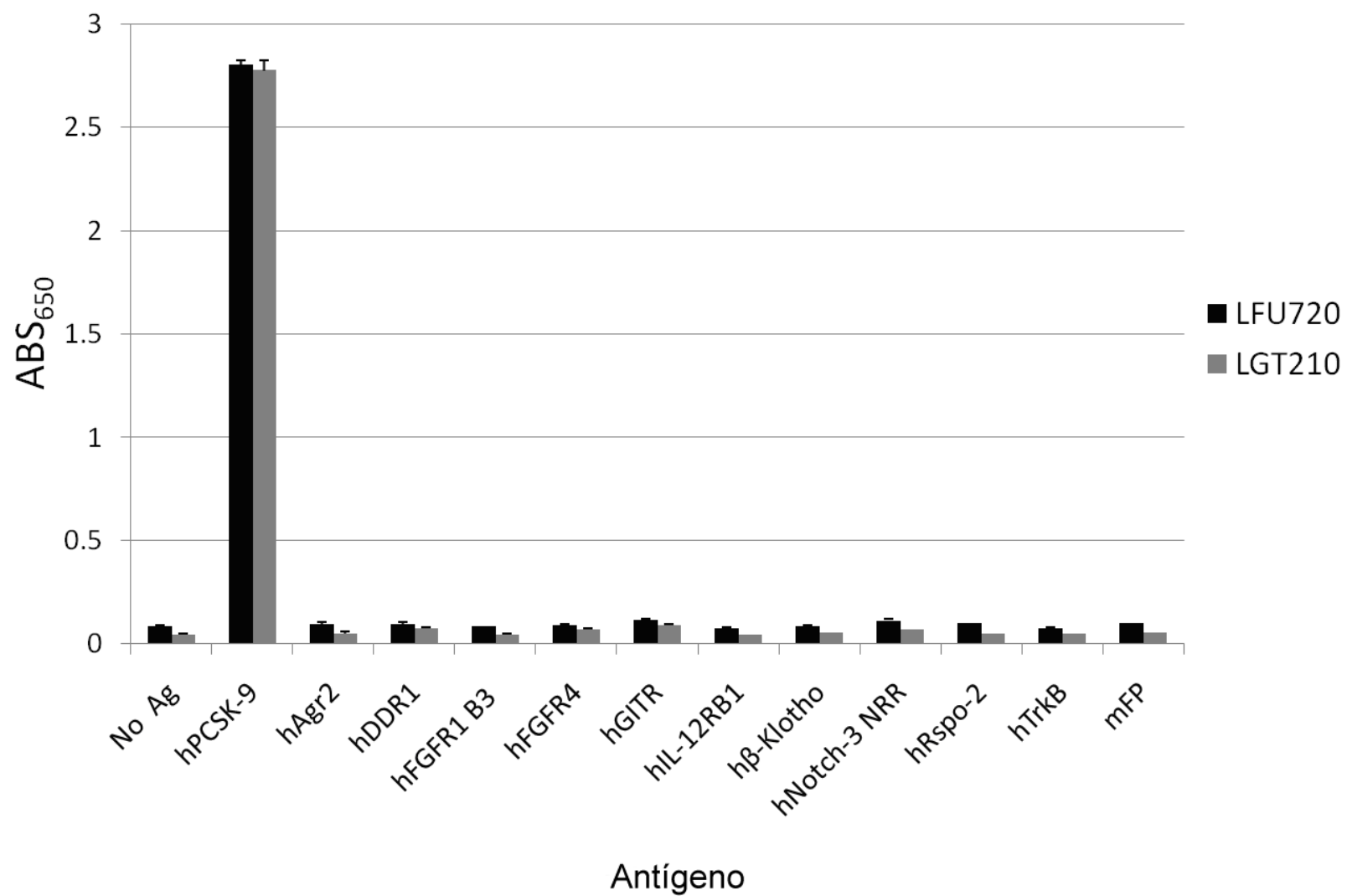


FIG. 5C

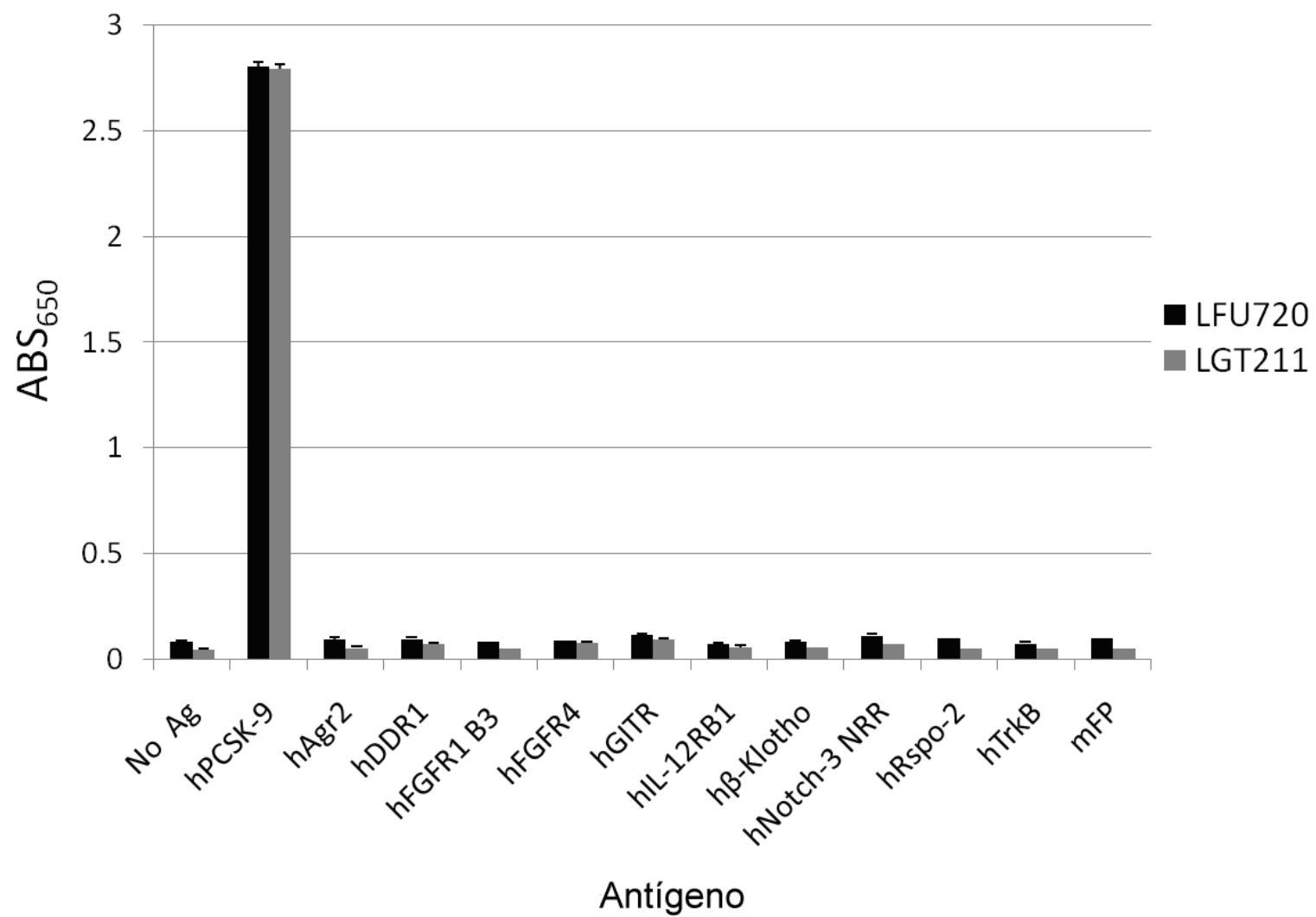


FIG. 6A

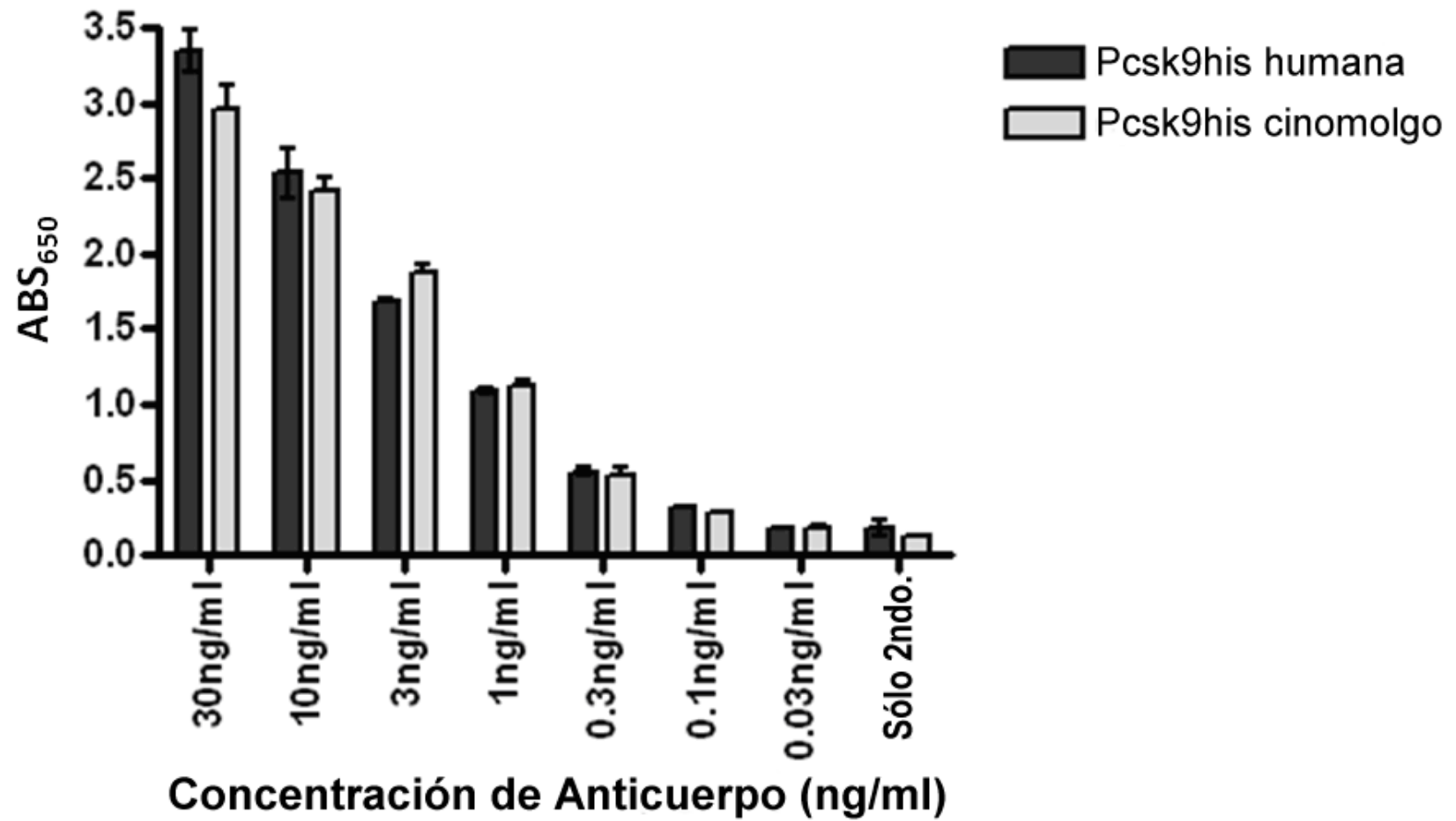


FIG. 6B

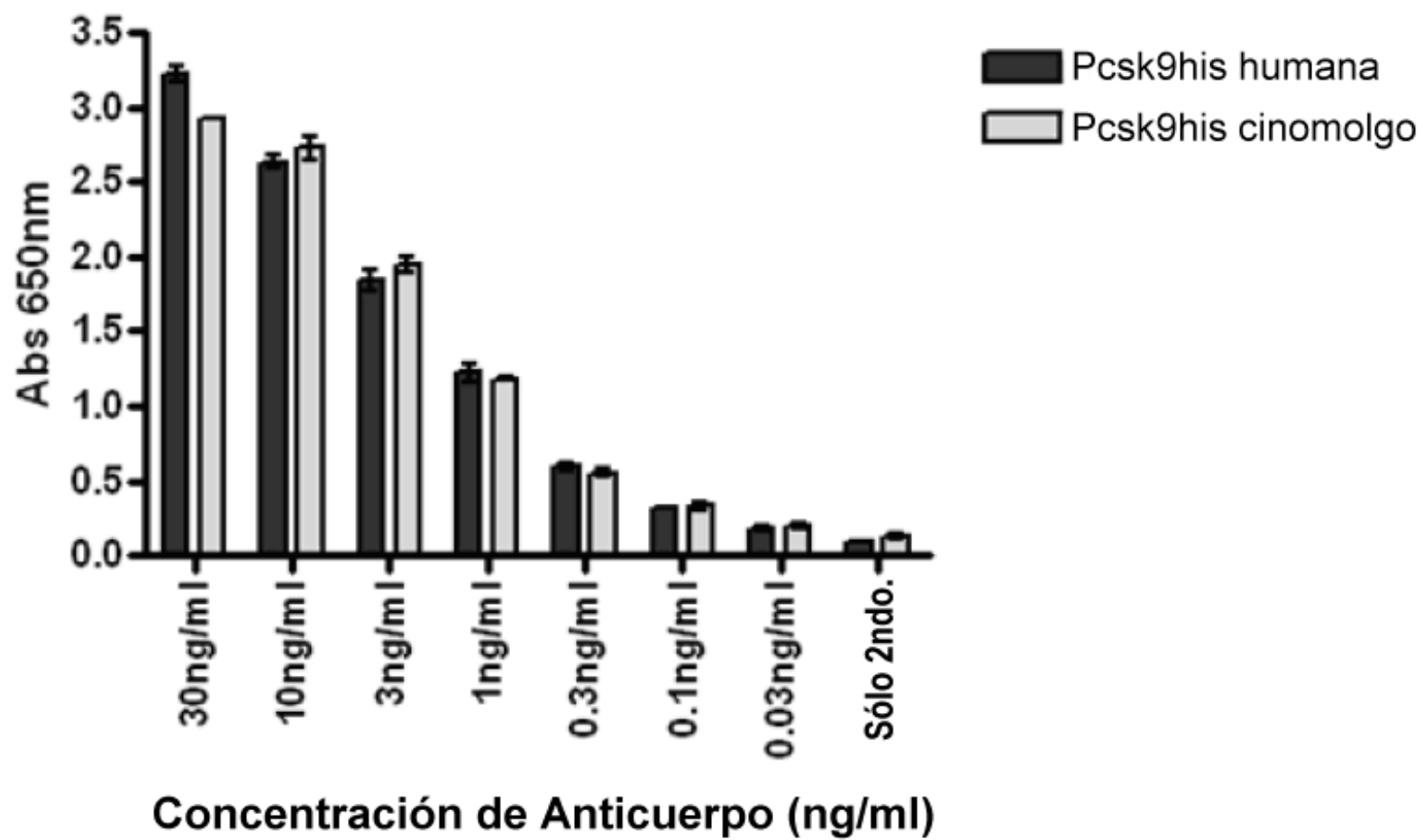


FIG. 6C

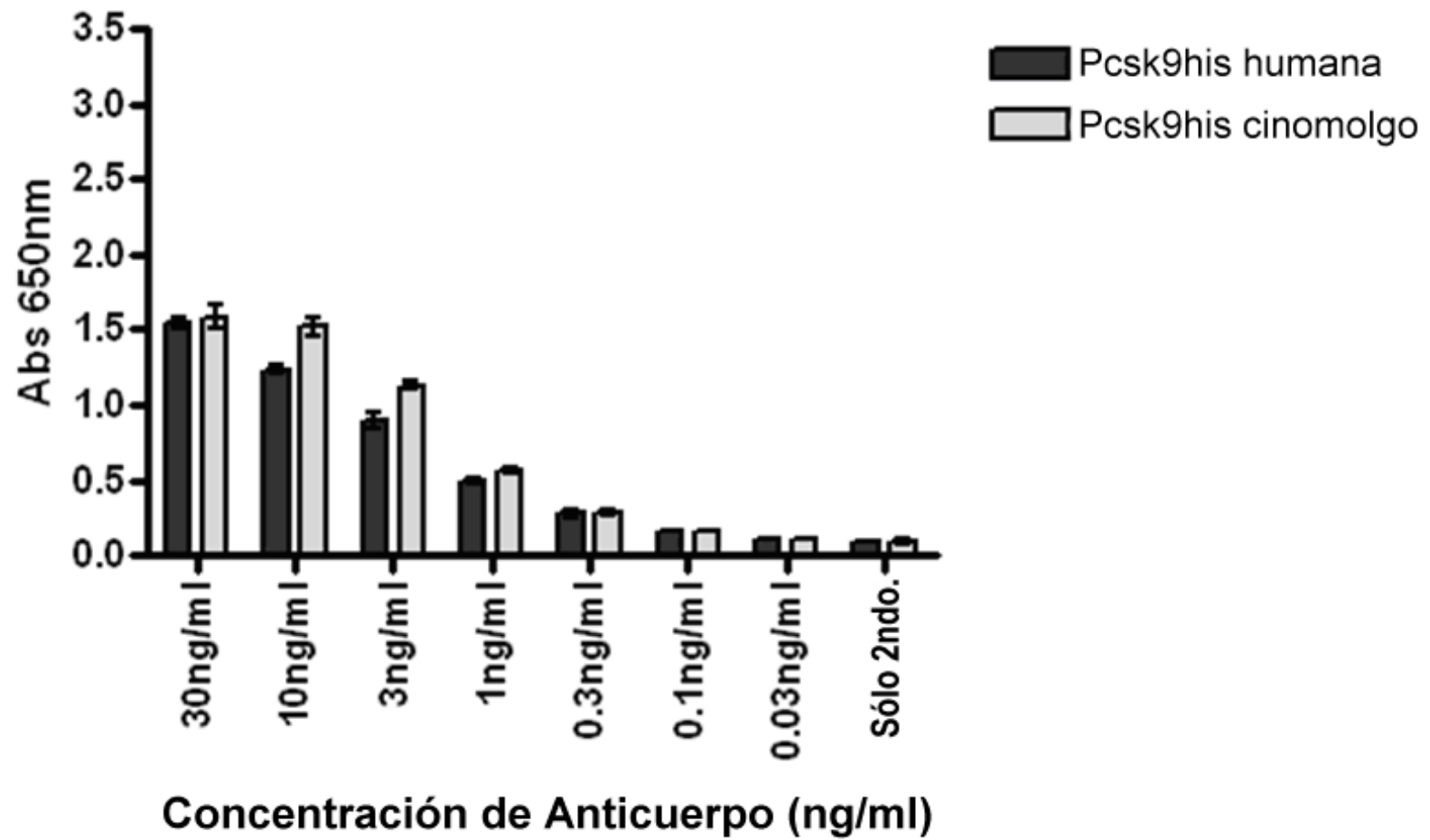


FIG. 7

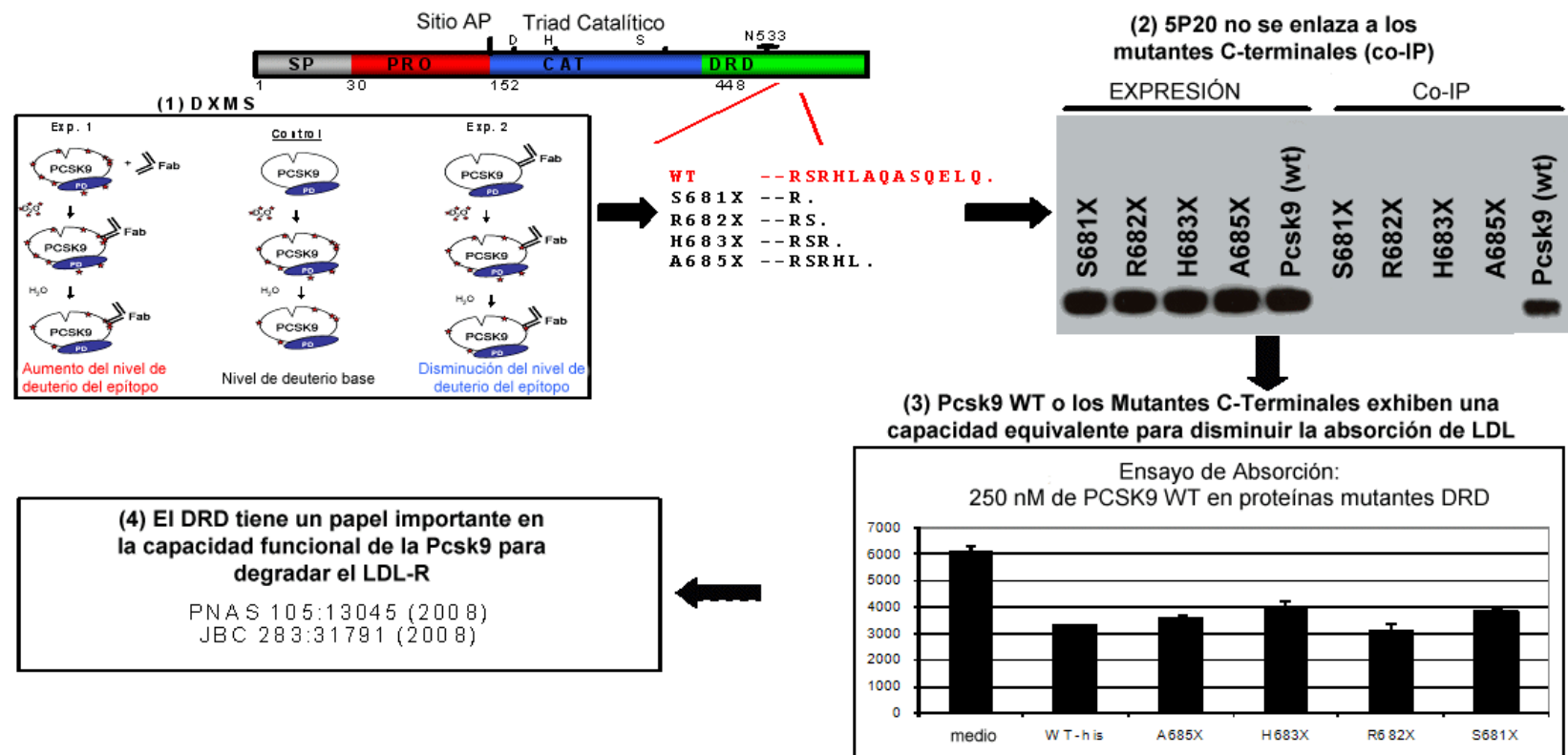


FIG. 8

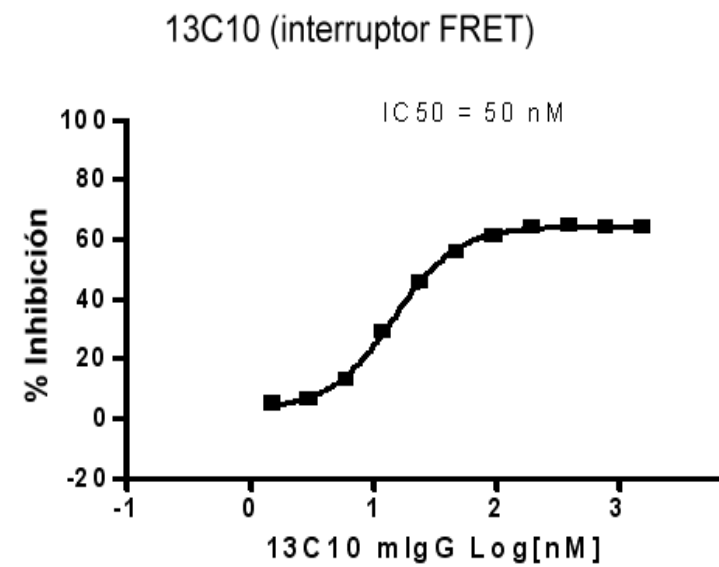
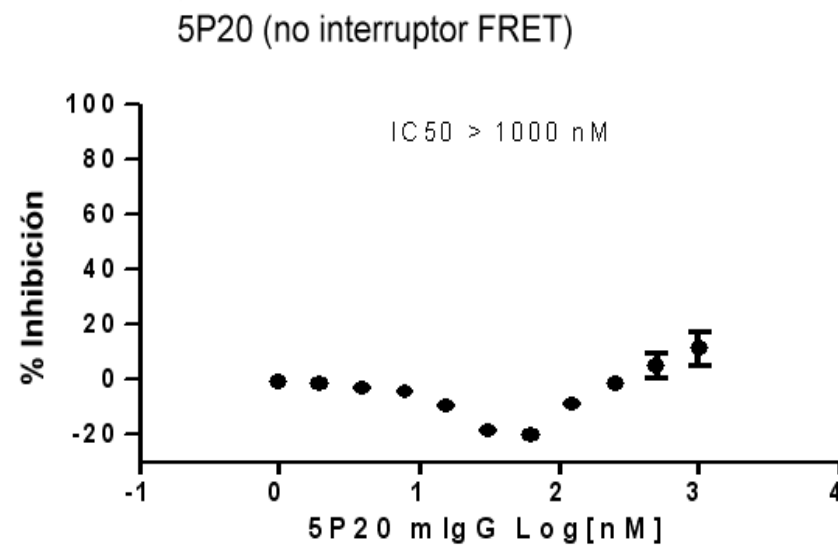
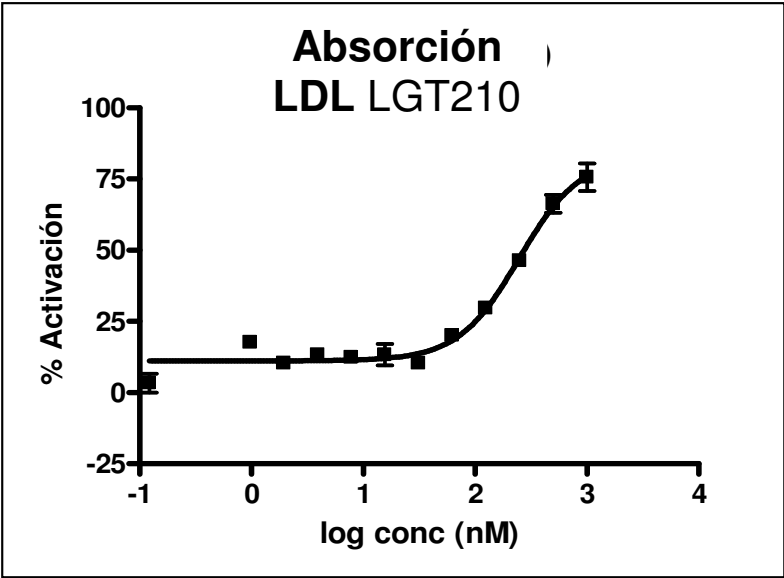
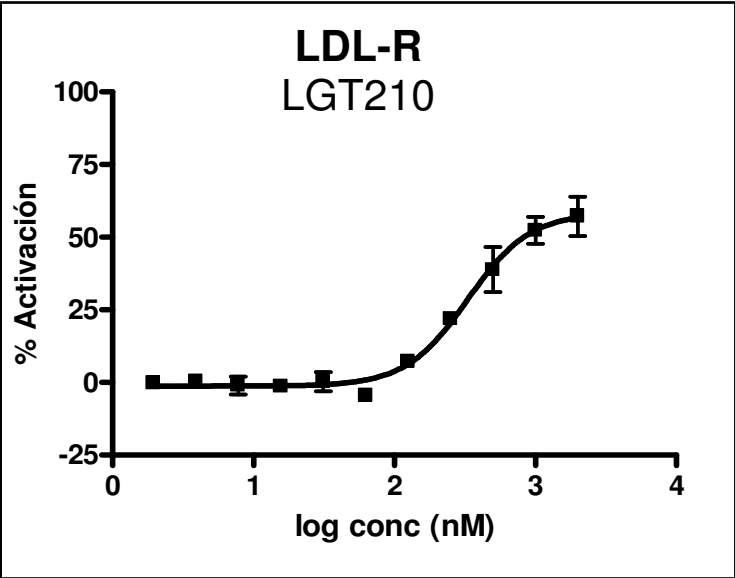


FIG. 9

Anticuerpo	Elevación LDL-R EC ₅₀	Absorción LDL EC ₅₀
LGT209	480 ± 64	255 ± 25
LGT210	480 ± 48	259 ± 22
LGT211	430 ± 60	230 ± 17
NVP-LFU720	520 ± 28	294 ± 62



Anticuerpo (*i.p.*) Implante mini-bomba osmótica con hPcsk9

- 3 h 0 24 h

The timeline consists of a horizontal orange bar representing time. At -3 h, there are two downward arrows labeled "Anticuerpo (*i.p.*)" and "Implante mini-bomba osmótica con hPcsk9". At 0 h, there is one downward arrow labeled "Implante mini-bomba osmótica con hPcsk9". At 24 h, there is a black rectangular box on the orange bar, with a vertical line extending downwards from its center.

-

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

FIG. 11

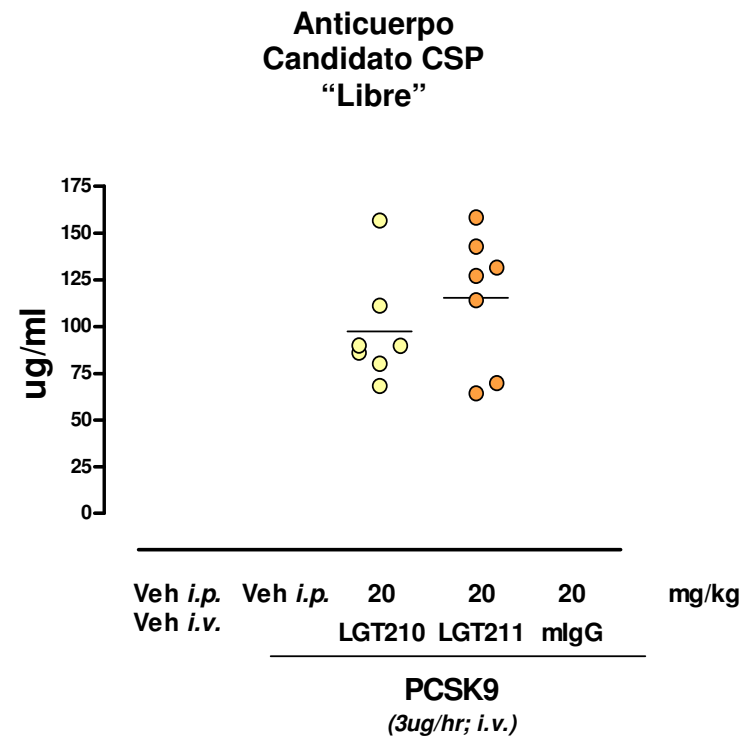
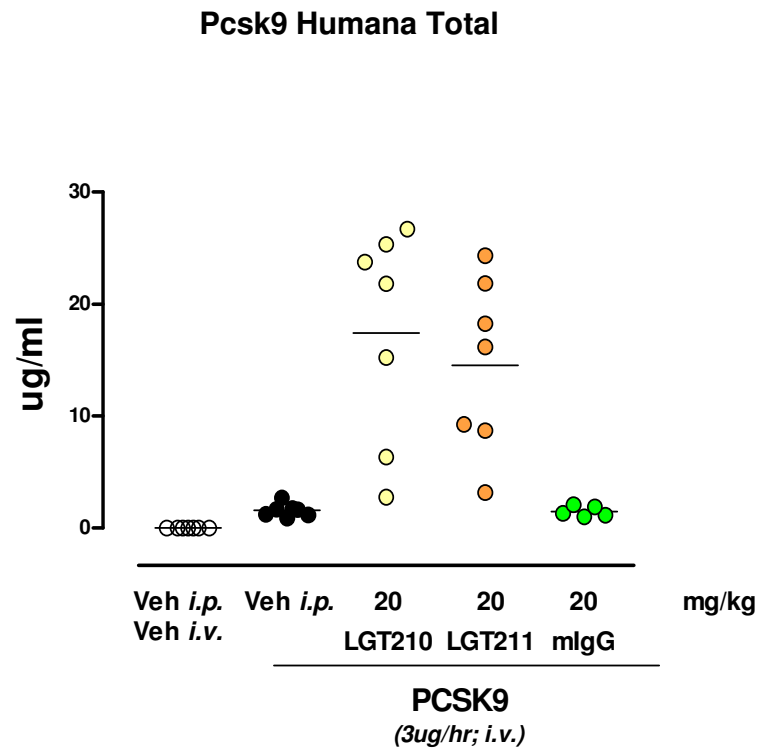


FIG. 12

LDL-R Western Blot de Preparaciones de Membrana de Hígado

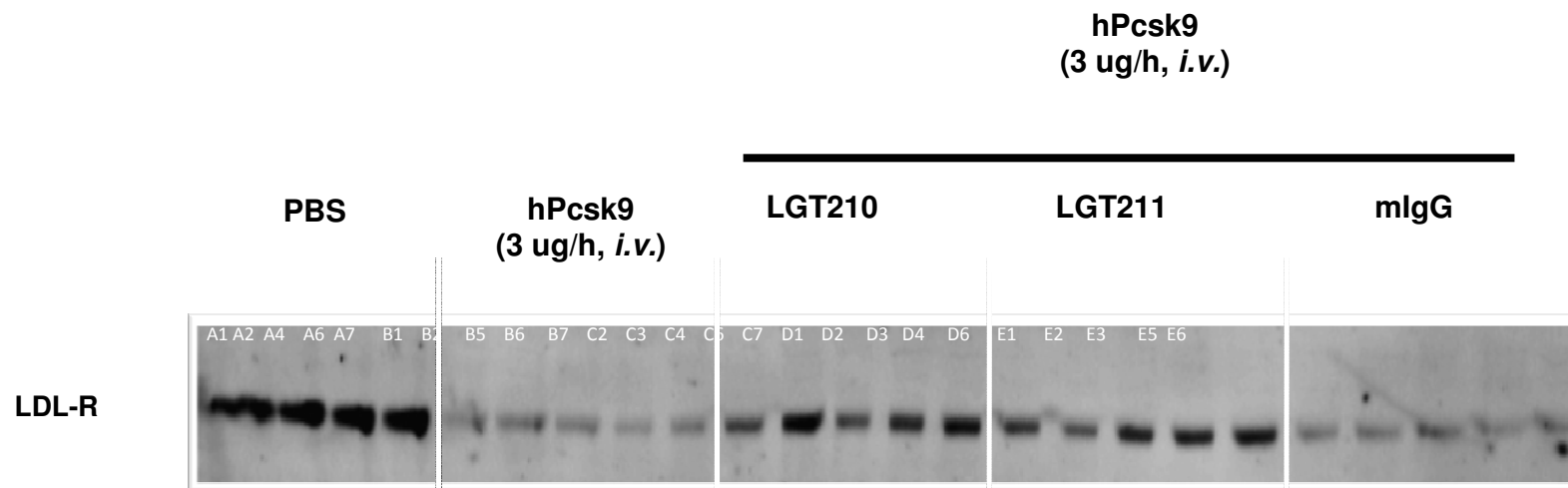
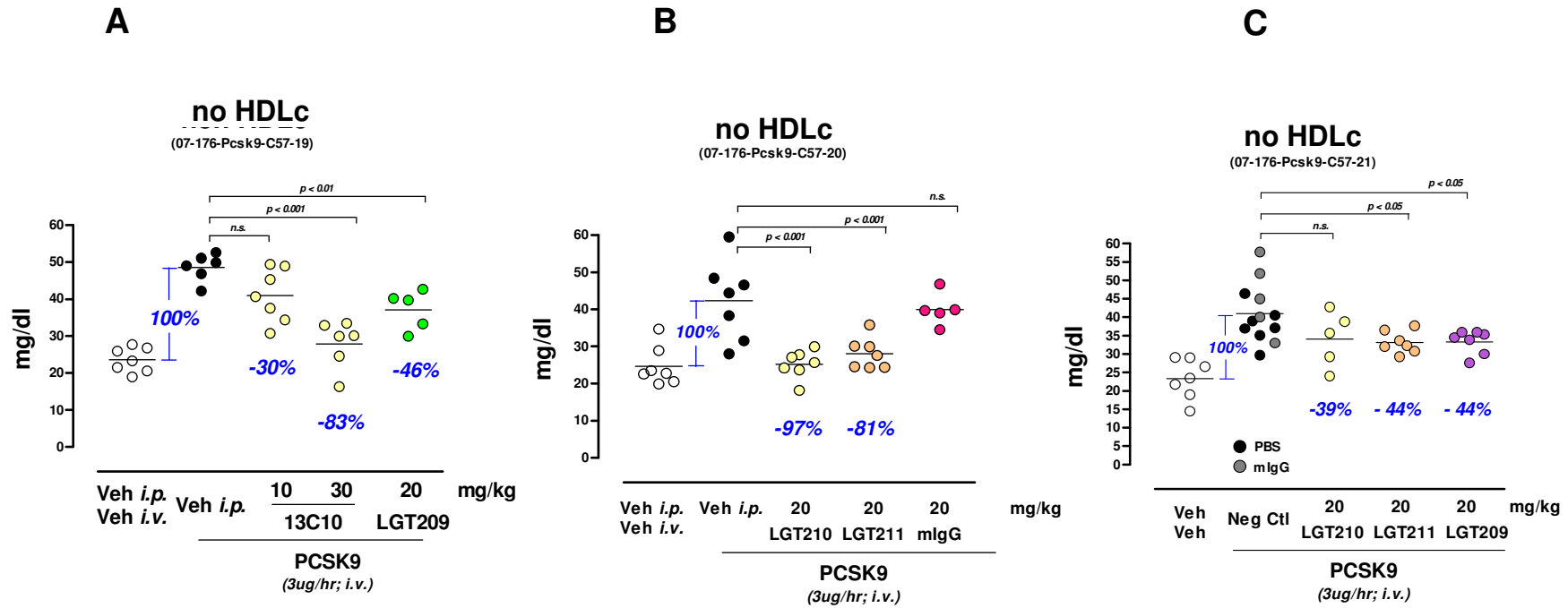
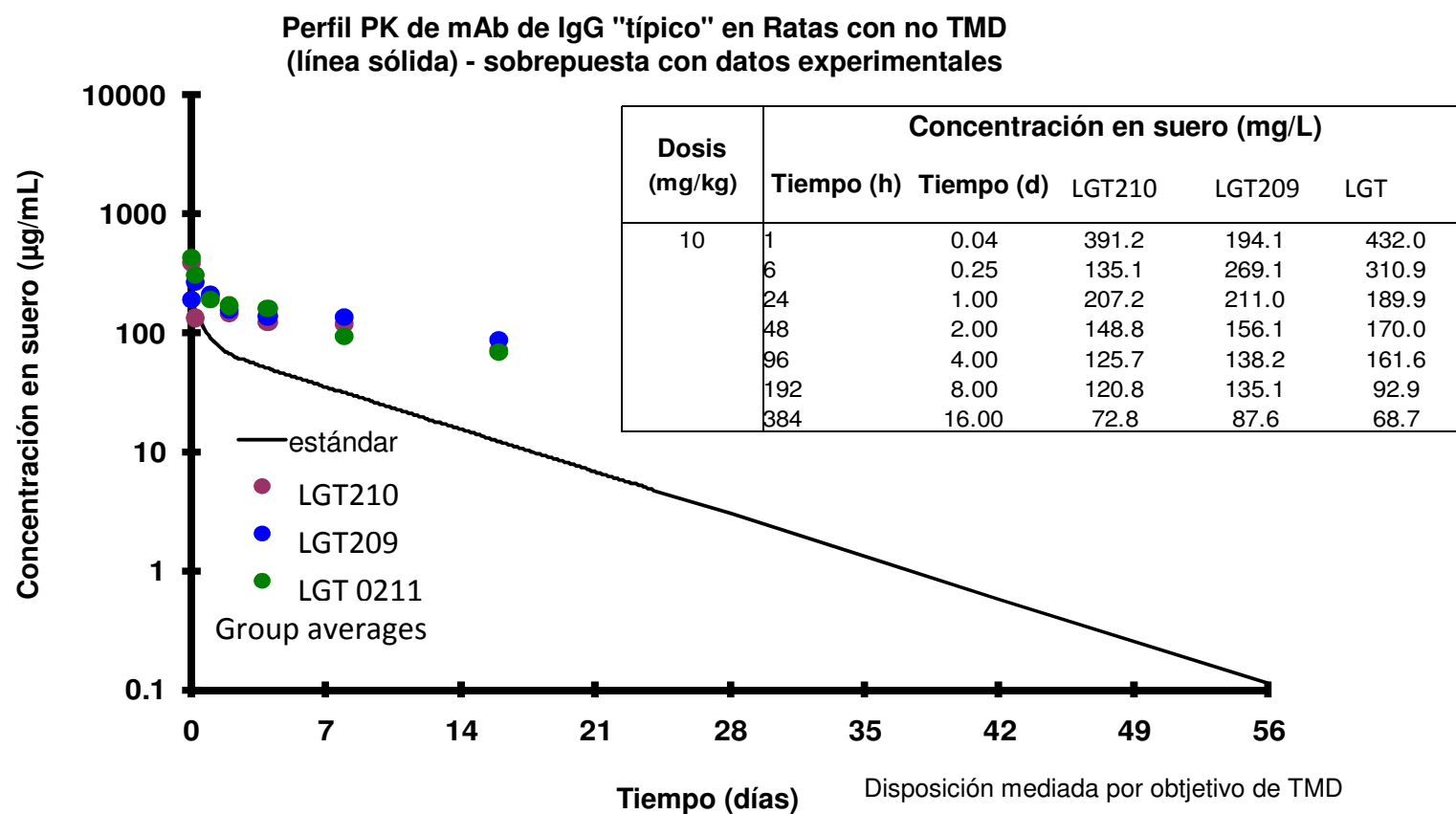


FIG. 13



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

FIG. 14



120625 4-Listado de Secuencias
SEQUENCE LISTING

<110> Rue, Sarah
Cohen, Steve B.
Yowe, David
IRM LLC
Novartis AG

<120> PCSK9 Antagonists

<130> PAT053967-WO-PCT

<140> WO Not yet assigned

<141> Not yet assigned

<150> US 61/285,942

<151> 2009-12-11

<160> 76

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody LFU720 heavy
chain variable region (FR1-FR4)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG04
(clones LGT-209 and LGT-210) vh heavy chain
variable region (FR1-FR4)

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

```

120625 4-Listado de Secuencias

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

<210> 3
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG04
 (clones LGT-209 and LGT-210) vh heavy chain
 including IgG1 constant chain

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (235)...(236)
 <223> Xaa = Ala or Leu

<400> 3																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10				15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Thr	Met	
			20					25					30			
Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Glu	His	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
	50					55					60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90				95			
Ala	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
			100					105					110			
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			115				120					125				
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
	195					200						205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210					215					220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	

120625 4-Listado de Secuencias

Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275					280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290					295					300				
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pSR74
 (clone LGT-211) vh heavy chain variable region
 (FR1-FR4)

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

<210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

120625 4-Listado de Secuencias

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pSR74
(clone LGT-211) vh heavy chain including IgG1
constant chain

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Ala or Leu

<400> 5

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

120625 4-Listado de Secuencias

420
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody
 LFU720 heavy chain complementarity determining
 region 1 (CDR1)

<400> 6
 Asp Met Tyr Met Ser
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-PCSK9 monoclonal antibody clones LGT-209,
 LGT-210 and LGT-211 heavy chain complementarity
 determining region 1 (CDR1)

<400> 7
 Thr Met Tyr Met Ser
 1 5

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

<220>
 <223> anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus heavy
 chain complementarity determining region 1 (CDR1)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Asp or Thr

<400> 8
 Xaa Met Tyr Met Ser
 1 5

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

<220>
 <223> synthetic mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody
 LFU270 heavy chain complementarity determining
 region 2 (CDR2)

120625 4-Listado de Secuencias

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

<210> 10
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
 LGT-209, LGT-210 and LGT-211 heavy chain
 complementarity determining region 2 (CDR2)

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

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
 heavy chain complementarity determining region 2
 (CDR2)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)...(7)
 <223> Xaa = Ala, Glu or Gly

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (12)...(12)
 <223> Xaa = Ala or Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = Pro or Gln

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (17)...(17)
 <223> Xaa = Ala or Gly

<400> 11
 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Xaa His Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Xaa

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

120625 4-Listado de Secuencias

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG04
(clones LGT-209 and LGT-210) Vh heavy chain
complementarity determining region 3 (CDR3)

<400> 12

Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody
LFU270 and anti-PCSK9 monoclonal antibody pSR74
(clone LGT-211) Vh heavy chain complementarity
determining region 3 (CDR3)

<400> 13

Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
heavy chain complementarity determining region 3
(CDR3)

<220>

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ala or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = Ala, Phe, Ser, Val or Tyr

<400> 14

Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Xaa
1 5

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody LFU720 light
chain variable region (FR1-FR4)

<400> 15

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

120625 4-Listado de Secuencias

```

1           5           10           15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
35
Leu Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
85
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100

```

<210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG10
 (clones LGT-209 and LGT-211) vk light chain
 variable region (FR1-FR4)

```

<400> 16
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
20
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35
Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
65
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
85
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100

```

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

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG10
 (clones LGT-209 and LGT-211) vk light chain
 including kappa constant chain

```

<400> 17
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
20
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35
Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
65

```

120625 4-Listado de Secuencias

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG01
(clone LGT-210) vk light chain variable region
(FR1-FR4)

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

<210> 19
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG01
(clone LGT-210) vk light chain including kappa
constant chain

<400> 19
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

120625 4-Listado de Secuencias

```

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

```

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody
 LFU720 light chain complementarity determining
 region 1 (CDR1)

<400> 20
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
 LGT-209, LGT-210 and LGT-211 light chain
 complementarity determining region 1 (CDR1)

<400> 21
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
 light chain complementarity determining region 1

120625 4-Listado de Secuencias

(CDR1)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Arg or Ser

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Gln or Ser

<400> 22

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

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody
LFU720 light chain complementarity determining
region 2 (CDR2)

<400> 23

Leu Thr Phe Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 light chain
complementarity determining region 1 (CDR1)

<400> 24

Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
light chain complementarity determining region 2
(CDR2)

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly or Leu

<220>

120625 4-Listado de Secuencias

<221> VARIANT
<222> (2)...(2)
<223> Xaa = Thr or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa = Asn or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Leu or Arg

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)...(7)
<223> Xaa = Ser or Thr

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

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody
LFU720 and anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 light chain
complementarity determining region 3 (CDR3)

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

<210> 27
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 heavy chain variable
segment (FR1-FR3)

<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Met
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

120625 4-Listado de Secuencias

Ala Arg

<210> 28
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
 heavy chain variable segment (FR1-FR3)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Asp or Thr

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (56)...(56)
 <223> Xaa = Ala, Glu or Gly

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (61)...(61)
 <223> Xaa = Ala or Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (62)...(62)
 <223> Xaa = Pro or Gln

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (66)...(66)
 <223> Xaa = Ala or Gly

<400> 28
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Xaa Met
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Xaa His Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe
 50 55 60
 Gln Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

<210> 29
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG10
 (clones LGT-209 and LGT-211) vk light chain
 variable segment (FR1-FR3)

120625 4-Listado de Secuencias

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG01
(clone LGT-210) vk light chain variable segment
(FR1-FR3)

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG01
(clones LGT-209, LGT-210 and LGT-211) consensus vk
light chain variable segment (FR1-FR3)

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Leu or Met

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Arg or Ser

<220>

<221> VARIANT

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

120625 4-Listado de Secuencias

<223> Xaa = Gln or Ser

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Gly or Leu

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Thr or Val

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Asn or Arg

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Leu or Arg

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Ser or Thr

<400> 31

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

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 heavy chain framework
region 1 (FR1)

<400> 32

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

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

120625 4-Listado de Secuencias

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 heavy chain framework
region 2 (FR2)

<400> 33

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

<210> 34

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 heavy chain framework
region 3 (FR3)

<400> 34

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

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 heavy chain framework
region 4 (FR4)

<400> 35

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

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
LGT-209, LGT-210 and LGT-211 consensus light chain
framework region 1 (FR1)

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Leu or Met

<400> 36

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

120625 4-Listado de Secuencias

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
 LGT-209, LGT-210 and LGT-211 light chain framework
 region 2 (FR2)

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

<210> 38
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
 LGT-209, LGT-210 and LGT-211 light chain framework
 region 3 (FR3)

<400> 38
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody clones
 LGT-209, LGT-210 and LGT-211 light chain framework
 region 4 (FR4)

<400> 39
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 40
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
 heavy chain variable region (FR1-FR4)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Asp or Thr

120625 4-Listado de Secuencias

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (56)...(56)
 <223> Xaa = Ala, Glu or Gly

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (61)...(61)
 <223> Xaa = Ala or Asp

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (62)...(62)
 <223> Xaa = Pro or Gln

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (66)...(66)
 <223> Xaa = Ala or Gly

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (104)...(104)
 <223> Xaa = Ala or Asn

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (107)...(107)
 <223> Xaa = Ala, Phe, Ser, Val or Tyr

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

<210> 41
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody consensus
 light chain variable region (FR1-FR4)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Leu or Met

120625 4-Listado de Secuencias

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (24)...(24)
 <223> Xaa = Arg or Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (27)...(27)
 <223> Xaa = Gln or Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (49)...(49)
 <223> Xaa = Gly or Leu

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (50)...(50)
 <223> Xaa = Thr or Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (52)...(52)
 <223> Xaa = Asn or Arg

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (53)...(53)
 <223> Xaa = Leu or Arg

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (55)...(55)
 <223> Xaa = Ser or Thr

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

<210> 42
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG04
 (clones LGT-209 and LGT-210) heavy chain

<400> 42
 caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60

120625 4-Listado de Secuencias

tcctgcaagg	cttctggata	caccttcagc	actatgtata	tgtcttgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggaagg	atcgatcctg	ccaatgagca	cactaactat	180
gcccagaagt	tccaggggag	ggtgactatg	acaaggggaca	catccatcag	cacagcctac	240
atggagctca	gcaggctgac	gtctgacgac	actgccgtct	attactgtgc	tagaagttac	300
tattactata	acatggacta	ctgggggtcaa	ggtaccctgg	tgaccgtcag	ctca	354

<210> 43
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pSR74
 (clone LGT-211) heavy chain

<400> 43	
caggttcagc	tggtgcagtc
tcctgcaagg	cttctggata
cctggacaag	ggcttgagtg
gcccagaagt	tccaggggag
atggagctca	gcaggctgac
tattactatg	ctatggacta
ctgggggtcaa	ggtaccctgg
tgaccgtcag	ctca
	354

<210> 44
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG01
 (clone LGT-210) light chain

<400> 44	
gaaatagtga	tgacgcagtc
ctctcctgca	gggccagtc
caggctccca	ggctcctcat
ttcagtggca	gtgggtctgg
gattttgcag	tgtactactg
acgaagcttg	aaattaaa
	318

<210> 45
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody pJG10
 (clones LGT-209 and LGT-211) light chain

<400> 45	
cagattgttc	tcacccagtc
ctctcctgca	gggccagtc
caggctccca	ggctcctcat
ttcagtggca	gtgggtctgg
gattttgcag	tgtactactg
acgaagcttg	aaattaaa
	318

<210> 46
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

120625 4-Listado de Secuencias

<223> synthetic anti-PCSK9 monoclonal antibody epitope

<400> 46

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

<210> 47

<211> 692

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> human proprotein convertase subtilisin/kexin type
9 (PCSK9), proprotein convertase 9 (PC9), neural
apoptosis-regulated convertase 1 (NARC1, NARC-1),
FH3, HCHOLA3, LDLCQ1 preproprotein

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)...(30)

<223> signal peptide

<220>

<221> PROPEP

<222> (31)...(692)

<223> proprotein

<220>

<221> CHAIN

<222> (153)...(692)

<223> mature protein

<400> 47

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

[illegible]

Página 22

120625 4-Listado de Secuencias

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (292)...(2370)
<223> human proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), proprotein convertase 9 (PC9), neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC1, NARC-1), FH3, HCHOLA3, LDLCQ1 preproprotein

<220>
<221> sig_peptide
<222> (292)...(381)
<223> signal peptide

<220>
<221> misc_structure
<222> (382)...(2367)
<223> proprotein

<220>
<221> mat_peptide
<222> (538)...(2367)
<223> mature protein

```

<400> 48
cagcgacgtc gaggcgctca tgggtgcagg cgggcgccgc cgttcagttc agggctctgag 60
cctggaggag tgagccaggc agtgagactg gctcggggcg gccgggacgc gtcgttgtag 120
cagcggctcc cagctcccag ccaggattcc gcgcgccccct tcacgcgccc tgctcctgaa 180
cttcagctcc tgcacagtcc tccccaccgc aagggtcaag gcgcccggcg cgtggaccgc 240
gcacggcctc taggtctcct cgccaggaca gcaacctctc ccctggccct catgggcacc 300
gtcagctcca ggcgggtcctg gtggccgctg ccaactgctgc tgctgctgct gctgctcctg 360
ggtcccgcgg gcgcccgtgc gcaggaggac gaggacggcg actacgagga gctggtgcta 420
gccttgctgt ccgaggagga cggcctggcc gaagcaccgc agcacggaac cacagccacc 480
ttccaccgct gcgccaagga tccgtggagg ttgcctggca cctacgtggt ggtgctgaag 540
gaggagaccc acctctcgca gtcagagcgc actgcccgcc gcctgcaggc ccaggctgcc 600
cgccggggat acctaccaa gatcctgcat gtcctccatg gccttcttcc tggcttcctg 660
gtgaagatga gtggcgacct gctggagctg gccttgaagt tgccccatgt cgactacatc 720
gaggaggact cctctgtctt tgcccagagc atcccgtgga acctggagcg gattacccct 780
ccacggtacc gggcgatga ataccagccc cccgacggag gcagcctggt ggagggtgat 840
ctcctagaca ccagcataca gagtgaccac cgggaaatcg agggcagggg catggtcacc 900
gacttcgaga atgtgcccga ggaggacggg acccgcttcc acagacaggc cagcaagtgt 960
gacagtcatg gcaccacact ggacgggggt gtcagcgccc gggatgccgg cgtggccaag 1020
ggtgccaaga tgcgcagcct gcgcgtgctc aactgccaag ggaagggcac ggtagcggc 1080
accctcatag gcctggagtt tattcggaag agccagctgg tccagcctgt gggggccactg 1140
gtggtgctgc tgcccctggc ggggtgggtac agccgcgtcc tcaacgccgc ctgccagcgc 1200
ctggcgaggg ctgggggtcgt gctggtcacc gctgccggca acttccggga cgatgcctgc 1260
ctctactccc cagcctcagc tcccaggtc atcacagttg gggccaccaa tgcccaagac 1320
cagccgggtga ccctggggac tttggggacc aactttggcc gctgtgtgga cctctttgcc 1380
ccaggggagg acatcatttg tgccctccagc gactgcagca cctgctttgt gtcacagagt 1440
gggacatcac aggtgctgc ccacgtggct ggcatgtag ccatgatgct gtctgccgag 1500
ccggagctca ccctggccga gttgaggcag agactgatcc acttctctgc caaagatgtc 1560
atcaatgagg cctggttccc tgaggaccag cgggtactga cccccaacct ggtggccgcc 1620
ctgcccccca gcacccatgg ggcaggttgg cagctgtttt gcaggactgt atggtcagca 1680
cactcggggc ctacacggat ggccacagcc gtcgcccgtc gcgcccaga tgaggagctg 1740
ctgagctgct ccagtttctc caggagtggg aagcggcggg gcgagcgcat ggaggcccaa 1800
gggggcaagc tggctgctgc ggccacaaac gcttttgggg gtgaggggtg ctacgccatt 1860
gccagggtgct gcctgtacc ccaggccaac tgcagcgtcc acacagctcc accagctgag 1920
gccagcatgg ggacccgtgt ccactgccac caacagggcc acgtcctcac aggtgcagc 1980
tcccactggg aggtggagga ccttggcacc cacaagccgc ctgtgctgag gccacgaggt 2040
cagcccaaac agtcggtggg ccacagggag gccaagcatcc acgcttcctg ctgccatgcc 2100
ccagggtctg aatgcaaaagt caaggagcat ggaatccccg cccctcagga gcaggtgacc 2160

```

120625 4-Listado de Secuencias

```

gtggcctgcg aggaggggctg gaccctgact ggctgcagtg ccctccctgg gacctccac 2220
gtcctggggg cctacgccgt agacaacacg tgtgtagtca ggagccggga cgtcagcact 2280
acaggcagca ccagcgaagg ggccgtgaca gccgttgcca tctgctgccg gagccggcac 2340
ctggcgaggg cctcccagga gctccagtg cagcccatc ccaggatggg tgtctgggga 2400
gggtcaaggg ctggggctga gctttaaaat gggtccgact tgtccctctc tcagccctcc 2460
atggcctggc acgaggggat ggggatgctt ccgcctttcc ggggctgctg gcctggccct 2520
tgagtggggc agcctccttg cctggaactc actcactctg ggtgcctcct cccaggtgg 2580
aggtgccagg aagctccctc cctcactgtg gggcatttca ccattcaaac aggtcgagct 2640
gtgctcgggt gctgccagct gctcccaatg tgccgatgtc cgtgggcaga atgactttta 2700
ttgagctctt gttccgtgcc aggattcaa tcctcaggtc tccaccaagg aggcaggatt 2760
cttcccatgg ataggggagg gggcggtagg ggctgcaggg acaaacatcg ttgggggggtg 2820
agtgtgaaaag gtgctgatgg ccctcatctc cagctaactg tggagaagcc cctgggggct 2880
ccctgattaa tggaggctta gctttctgga tggcatctag ccagaggctg gagacagggtg 2940
cgcccctggt ggtcacaggc tgtgccttgg tttcctgagc cacttttact ctgctctatg 3000
ccaggctgtg ctagcaaac ccaaagggtg cctgcgggga gccatcacct aggactgact 3060
cggcagtggt cagtgggtgca tgcactgtct cagccaaccc gctccactac ccggcagggt 3120
acacattcgc acccctactt cacagaggaa gaaacctgga accagagggg gcgtgcctgc 3180
caagctcaca cagcaggaac tgagccagaa acgcagattg ggctggctct gaagccaagc 3240
ctcttcttac ttcacccggc tgggctcctc atttttacgg gtaacagtga ggctgggaag 3300
gggaacacag accaggaagc tcggtgagt atggcagaac gatgcctgca ggcatggaac 3360
tttttccgtt atcacccagg cctgattcac tggcctggcg gagatgcttc taaggcatgg 3420
tcggggggaga gggccaacaa ctgtccctcc ttgagcacca gccccaccca agcaagcaga 3480
catttatctt ttgggtctgt cctctctgtt gcctttttac agccaacttt tctagacctg 3540
ttttgctttt gtaacttgaa gatatttatt ctgggttttg tagcattttt attaatatgg 3600
tgacttttta aaataaaaac aaacaaacgt tgtcct 3636

```

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 C-terminus epitope, residues 680-692

<400> 49

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

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic human germline JH4 partial sequence in anti-PCSK9 heavy chain J-segment

<400> 50

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

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic full-length J-segment from human germline JH4

120625 4-Listado de Secuencias

<400> 51

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

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic human germline Jk2 partial sequence in
anti-PCSK9 light chain J-segment

<400> 52

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

<210> 53

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic full-length J-segment from human
germline Jk2

<400> 53

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

<210> 54

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody LFU270 heavy
chain variable region

<400> 54

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttatgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
tcctgcacag cttctggctt caacatcaaa gacatgtata tgagctgggt gaggcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggaagg atcgatcctg cgaatgggtca tactaactat 180
gacccgaagt tccaggccaa ggccactata acaacagaca catcctccaa aacagcctac 240
ctgcatctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaagttac 300
tattactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ttca 354

<210> 55

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> mouse anti-PCSK9 monoclonal antibody LFU270 light
chain variable region

<400> 55

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120
tcctcccca gactctggat ttatttaaca ttcaacttgg cttctggagt ccctgctcgc 180

120625 4-Listado de Secuencias

```

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctctcaa tcagcagcat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg tctacagtgg agtagtgacc cacccacgtt cggctcgggg 300
acaaagttgg aaataaaa                                     318

```

```

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic PCSK9 C-terminal mutant A685X

```

```

<400> 56
Arg Ser Arg His Leu
 1                5

```

```

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic C-terminal his6 tag, 6-His tag, HIS-tag

```

```

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

```

```

<210> 58
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic RT-PCR amplification primer V-H14 for
      heavy chain variable region

```

```

<400> 58
cttcctgatg gcagtgggtt                                     19

```

```

<210> 59
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic RT-PCR amplification primer HCconstant
      for heavy chain variable region

```

```

<400> 59
gcgtctagaa yctccacaca caggrrrccag tggatagac                                     39

```

```

<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic RT-PCR amplification primer Vkappa4/5
      for light chain variable region

```

120625 4-Listado de Secuencias

<400> 60
tcagcttctgt gctaatcagt g 21

<210> 61
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic RT-PCR amplification primer LCconstant
for light chain variable region

<400> 61
gcgtctagaa ctggatggg ggaagatgg 29

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic C-terminal flexible linker and 6-His tag

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

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic Avi tag for site-directed biotinylation

<400> 63
Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
1 5 10 15
Glu

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic CDRH1 of SR066 (humaneered)

<400> 64
Thr Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic CDRH1 of SR038 (mouse)

120625 4-Listado de Secuencias

<400> 65

Asp Met Tyr Met Ser
1 5

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic CDRH1 of SR079 (humaneered)

<400> 66

Thr Met Tyr Met Ser
1 5

<210> 67

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 7472 light chain (LC) N-terminus

<400> 67

Glu Ile Val Met
1

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 7472 light chain (LC) CDR1

<400> 68

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

<210> 69

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic LFU720 and pJG10 light chain (LC)
N-terminus

<400> 69

Gln Ile Val Leu
1

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

120625 4-Listado de Secuencias

<220>

<223> synthetic LFU720 light chain (LC) complementarity
determining region 1 (CDR1)

<400> 70

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

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic pJG10 light chain (LC) complementarity
determining region 1 (CDR1)

<400> 71

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

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic 7472 and LFU720 heavy chain CDR3 (CDRH3)

<400> 72

Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic pJG04 heavy chain CDR3 (CDRH3)

<400> 73

Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 heavy chain CDR2

<400> 74

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

120625 4-Listado de Secuencias

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 heavy chain CDR3

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa = Ala or Asn

<400> 75

Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Tyr
1 5

<210> 76

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic anti-PCSK9 light chain FR1

<220>

<221> VARIANT

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

<223> Xaa = Met or Leu

<400> 76

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rue, Sarah
Cohen, Steve B.
5 Yowe, David
IRM LLC
Novartis AG
<120> Antagonistas de PCSK9
<130> 021288-006410PC
10 <140> WO todavía no asignada
<141> Todavía no asignada
<150> US 61/285,942
<151> 2009-12-11
<160> 76
15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus
20 <220>
<223> anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCSK9 LFU720
región variable de cadena pesada (FR1-FR4)
<400> 1
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
25 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Met
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
5 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Ala Lys Ala Thr Ile Thr Thr Asp Thr Ser Ser Lys Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
10 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115
15 <210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
20 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG04
 (clones LGT-209 y LGT-210)
 región variable de cadena pesada Vh (FR1-FR4)
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
25 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Met
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
5 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
10 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
15
 <210> 3
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
20 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG04
 (clones LGT-209 y LGT-210) - cadena pesada Vh
 que incluye cadena constante de IgG1
 <220>
25 <221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Ala o Leu

<400> 3

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 5 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 10 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 15 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 20 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 25 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
5 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
10 435 440 445
 <210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
15 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pSR74
 (clon LGT-211) - región variable de cadena pesada Vh
 (FR1-FR4)
 <400> 4
20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Thr Met
 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
25 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
5 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
10 115
 <210> 5
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
15 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pSR74
 (clon LGT-211) - cadena pesada Vh que incluye
 cadena constante de IgG1
 <220>
20 <221> VARIANTE
 <222> (235)...(236)
 <223> Xaa = Ala o Leu
 <400> 5
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
25 1 5 10 15

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

	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210							215								220
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Xaa	Xaa	Gly	Gly	Pro	Ser
5	225						230					235				240
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
							245					250				255
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
							260					265				270
10	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
							275									285
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
							290									300
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
15	305						310					315				320
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
							325					330				335
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
							340					345				350
20	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
							355									365
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
							370									380
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
25	385						390					395				400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

5 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético de ratón anti-PCSK9

LFU720 - cadena pesada - región determinante de
complementariedad 1 (CDR1)

15 <400> 6

Asp Met Tyr Met Ser

1 5

<210> 7

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 7
 Thr Met Tyr Met Ser
 1 5
 <210> 8
 5 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 cadena pesada en
 10 consenso - región determinante de complementariedad 1 (CDR1)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = Asp o Thr
 15 <400> 8
 Xaa Met Tyr Met Ser
 1 5
 <210> 9
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético de ratón anti-PCSK9
 LFU270 - cadena pesada - región determinante de
 25 complementariedad 2 (CDR2)

<400> 9

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly His Thr Asn Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1

5

10

15

Ala

5

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 - clones

LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena pesada -

región determinante de complementariedad 2 (CDR2)

<400> 10

15

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 11

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 - cadena

25

pesada en consenso - región determinante de complementariedad 2

```

(CDR2)

<220>

<221> VARIANTE

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

5  <223> Xaa = Ala, Glu o Gly

<220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Ala o Asp

10 <220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Pro o Gln

<220>

15 <221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Ala o Gly

<400> 11

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Xaa His Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe Gln

20  1                5                10                15

Xaa

<210> 12

<211> 9

25 <212> PRT

```

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG04
 (clones LGT-209 y LGT-210) - cadena pesada Vh -
 5 región determinante de complementariedad 3 (CDR3)
 <400> 12
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 13
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético de ratón anti-PCSK9
 15 LFU270 y anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 pSR74
 (clon LGT-211) - cadena pesada Vh - región determinante de
 complementariedad 3 (CDR3)
 <400> 13
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 20 1 5
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>

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

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ala o Asn
 <220>

10 <221> VARIANTE
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = Ala, Phe, Ser, Val o Tyr
 <400> 14
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Xaa

15 1 5
 <210> 15
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCSK9 LFU720
 región variable de cadena ligera (FR1-FR4)
 <400> 15
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

25 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
5 Leu Thr Phe Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Ser Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
10 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 16
 <211> 106
15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG10
 (clones LGT-209 y LGT-211) - región variable
20 de cadena ligera Vk (FR1-FR4)
 <400> 16
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
25 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
5 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
10 100 105
 <210> 17
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
15 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG10
 (clones LGT-209 y LGT-211) - cadena ligera Vk
 que incluye cadena constante kappa
 <400> 17
20 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
25 35 40 45

Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
5 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
10 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
15 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
20 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 18
 <211> 106
25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG01

(clon LGT-210) - región variable de cadena ligera Vk

5 (FR1-FR4)

<400> 18

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

15 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr

85 90 95

20 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 19

<211> 213

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG01

(clon LGT-210) - cadena ligera Vk que incluye cadena
constante kappa

5

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

10

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

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

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

15

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

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

20

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

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

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

25

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
5 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 20
10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético de ratón anti-PCSK9
15 LFU720 - cadena ligera - región determinante de
 complementariedad 1 (CDR1)
 <400> 20
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10
20 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
25 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 -

clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera -
región determinante de complementariedad 1 (CDR1)

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His

5 1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9

cadena ligera en consenso - región determinante de
complementariedad 1 (CDR1)

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Arg o Ser

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (4)...(4)

<223> Xaa = Gln o Ser

<400> 22

Xaa Ala Ser Xaa Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

25 <210> 23

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
5 <223> anticuerpo monoclonal sintético de ratón anti-PCSK9
 LFU720 - cadena ligera - región determinante de
 complementariedad 2 (CDR2)
 <400> 23
 Leu Thr Phe Asn Leu Ala Ser
10 1 5
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
15 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera -
 región determinante de complementariedad 1 (CDR1)
 <400> 24
20 Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9

cadena ligera en consenso - región determinante de
complementariedad 2 (CDR2)

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly o Leu

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = Thr o Val

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (4)...(4)

<223> Xaa = Asn o Arg

<220>

<221> VARIANTE

<222> (5)...(5)

20 <223> Xaa = Leu o Arg

<220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Ser o Thr

25 <400> 25

Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Ala Xaa
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético de ratón anti-PCSK9
 LFU720 y anticuerpo monoclonal anti-PCSK9 -
 10 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera -
 región determinante de complementariedad 3 (CDR3)
 <400> 26
 Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
 1 5
 15 <210> 27
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - segmento variable
 de cadena pesada (FR1-FR3)
 <400> 27
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 25 1 5 10 15

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

 <210> 28
 <211> 98
15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 segmento variable de cadena pesada en consenso (FR1-FR3)
20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Asp o Thr
 <220>
25 <221> VARIANTE

<222> (56)...(56)
 <223> Xaa = Ala, Glu o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
5 <222> (61)...(61)
 <223> Xaa = Ala o Asp
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (62)...(62)
10 <223> Xaa = Pro o Gln
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (66)...(66)
 <223> Xaa = Ala o Gly
15 <400> 28

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

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

Ala Arg

5 <210> 29
<211> 87
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

10 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG10
(clones LGT-209 y LGT-211) - cadena ligera Vk -
segmento variable (FR1-FR3)
<400> 29

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

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

20 Gly Val Phe Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

25 85

<210> 30

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG01

(clon LGT-210) - cadena ligera Vk - segmento variable

(FR1-FR3)

<400> 30

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

<210> 31

<211> 87

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

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

5 <220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Leu o Met

<220>

10 <221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Arg o Ser

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (27)...(27)

<223> Xaa = Gln o Ser

<220>

<221> VARIANTE

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

20 <223> Xaa = Gly o Leu

<220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Thr o Val

25 <220>

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

5 <221> VARIANTE
 <222> (53)...(53)
 <223> Xaa = Leu o Arg
 <220>

10 <221> VARIANTE
 <222> (55)...(55)
 <223> Xaa = Ser o Thr
 <400> 31

Glx Ile Val Xaa Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

15 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Xaa Ala Ser Xaa Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Ala Xaa Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

20 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 85

25 <210> 32

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena pesada -
 región de estructura 1 (FR1)
 <400> 32
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 10 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30
 <210> 33
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena pesada -
 20 región de estructura 2 (FR2)
 <400> 33
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 <210> 34
 25 <211> 32

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 5 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena pesada -
 región de estructura 3 (FR3)
 <400> 34
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 10 Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena pesada -
 región de estructura 4 (FR4)
 20 <400> 35
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 22
 25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera en consenso -
 5 región de estructura 1 (FR1)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 <223> Xaa = Leu o Met
 10 <400> 36
 Glx Ile Val Xaa Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 20
 15 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera -
 región de estructura 2 (FR2)
 <400> 37
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 25 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9
 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera -
 región de estructura 3 (FR3)

<400> 38

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

<210> 39

15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9

20 clones LGT-209, LGT-210 y LGT-211 - cadena ligera -
 región de estructura 4 (FR4)

<400> 39
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

25 <210> 40

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 - región
 variable de cadena pesada en consenso (FR1-FR4)
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (31)...(31)
 <223> Xaa = Asp o Thr
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (56)...(56)
 15 <223> Xaa = Ala, Glu o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (61)...(61)
 <223> Xaa = Ala o Asp
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (62)...(62)
 <223> Xaa = Pro o Gln
 <220>
 25 <221> VARIANTE

<222> (66)...(66)
 <223> Xaa = Ala o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
5 <222> (104)...(104)
 <223> Xaa = Ala o Asn
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (107)...(107)
10 <223> Xaa = Ala, Phe, Ser, Val o Tyr
 <400> 40
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Xaa Met
15 20 25 30
 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Xaa His Thr Asn Tyr Xaa Xaa Lys Phe
 50 55 60
20 Gln Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
25 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9

región variable de cadena ligera en consenso (FR1-FR4)

10 <220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Leu o Met

<220>

15 <221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Arg o Ser

<220>

<221> VARIANTE

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

<223> Xaa = Gln o Ser

<220>

<221> VARIANTE

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

25 <223> Xaa = Gly o Leu

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50) ... (50)
 <223> Xaa = Thr o Val
5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (52) ... (52)
 <223> Xaa = Asn o Arg
 <220>
10 <221> VARIANTE
 <222> (53) ... (53)
 <223> Xaa = Leu o Arg
 <220>
 <221> VARIANTE
15 <222> (55) ... (55)
 <223> Xaa = Ser o Thr
 <400> 41

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Gly Arg Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr

85 90 95

5 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 42

<211> 354

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG04

(clones LGT-209 y LGT-210) - cadena pesada

<400> 42

15 caggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggata caccttcagc actatgtata tgtcttgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcgatcctg ccaatgagca cactaactat 180
gccagaagt tccaggggag ggtgactatg acaagggaca catccatcag cacagcctac 240
atggagctca gcaggctgac gtctgacgac actgccgtct attactgtgc tagaagttac 300

20 tattactata acatggacta ctgggggtcaa ggtaccctgg tgaccgtcag ctca 354

<210> 43

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 $\langle 220 \rangle$

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pSR74

(clon LGT-211) - cadena pesada

<400> 43

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

10 <210> 44

<211> 318

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG01

(clon LGT-210) - cadena ligera

<400> 44

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc tatatgcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
 20 caggctccca ggctcctcat atatggtggt ttcagaaggg ccactggcat cccagacagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcggcagact ggagcctgaa 240
 gattttgcag tgtactactg cctacagtgg agtagtgacc caccacggt tggccaagg 300
 acgaagcttg aaattaaa 318

<210> 45

25 <211> 318

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 pJG10

5 (clones LGT-209 y LGT-211) - cadena ligera

<400> 45

cagattgttc tcacccagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc tatatgcatt ggtaccagca gaagccaggc 120

caggctccca ggctcctcat atatggtgtt ttcagaaggc cactggcat cccagacagg 180

10 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcggcagact ggagcctgaa 240

gattttgcag tgtactactg cctacagtgg agtagtgacc caccacggt tggccaaggc 300

acgaagcttg aaattaaa 318

<210> 46

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anticuerpo monoclonal sintético anti-PCSK9 - epítipo

<400> 46

20 Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln

1

5

10

<210> 47

<211> 692

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> pro-proteína convertasa-subtilisina humana/quexina tipo
 9 (PCSK9), pro-proteína convertasa 9 (PC9), convertasa
 5 regulada por apoptosis neural 1 (NARC1, NARC-1),
 FH3, HCHOLA3, LDLCQ1 pre-proteína
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(30)
 10 <223> péptido de señal
 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (31)...(692)
 <223> pro-proteína
 15 <220>
 <221> CADENA
 <222> (153)...(692)
 <223> proteína madura
 <400> 47
 20 Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 -30 -25 -20 -15
 Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
 -10 -5 1
 Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
 25 5 10 15

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

	Gln	Arg	Val	Leu	Thr	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr
				405				410					415			
	His	Gly	Ala	Gly	Trp	Gln	Leu	Phe	Cys	Arg	Thr	Val	Trp	Ser	Ala	His
5		420					425						430			
	Ser	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Cys	Ala	Pro	Asp
	435					440					445				450	
	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Cys	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Arg	Arg
					455					460					465	
10	Gly	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Lys	Leu	Val	Cys	Arg	Ala	His
				470					475					480		
	Asn	Ala	Phe	Gly	Gly	Glu	Gly	Val	Tyr	Ala	Ile	Ala	Arg	Cys	Cys	Leu
				485				490						495		
	Leu	Pro	Gln	Ala	Asn	Cys	Ser	Val	His	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Glu	Ala
15		500						505					510			
	Ser	Met	Gly	Thr	Arg	Val	His	Cys	His	Gln	Gln	Gly	His	Val	Leu	Thr
	515					520					525				530	
	Gly	Cys	Ser	Ser	His	Trp	Glu	Val	Glu	Asp	Leu	Gly	Thr	His	Lys	Pro
					535					540					545	
20	Pro	Val	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Asn	Gln	Cys	Val	Gly	His	Arg
				550					555					560		
	Glu	Ala	Ser	Ile	His	Ala	Ser	Cys	Cys	His	Ala	Pro	Gly	Leu	Glu	Cys
				565					570					575		
	Lys	Val	Lys	Glu	His	Gly	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln	Glu	Gln	Val	Thr	Val
25		580						585						590		

Ala Cys Glu Glu Gly Trp Thr Leu Thr Gly Cys Ser Ala Leu Pro Gly
595 600 605 610
Thr Ser His Val Leu Gly Ala Tyr Ala Val Asp Asn Thr Cys Val Val
615 620 625
5 Arg Ser Arg Asp Val Ser Thr Thr Gly Ser Thr Ser Glu Gly Ala Val
630 635 640
Thr Ala Val Ala Ile Cys Cys Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser
645 650 655
Gln Glu Leu Gln
10 660
<210> 48
<211> 3636
<212> ADN
<213> Homo sapiens
15 <220>
<221> CDS
<222> (292)...(2370)
<223> pro-proteína covertasa-subtilisina humana/quexina tipo
9 (PCSK9), pro-proteína convertasa 9 (PC9), convertasa
20 regulada por apoptosis neural 1 (NARC1, NARC-1),
FH3, HCHOLA3, LDLCQ1 pre-proteína
<220>
<221> péptido_señal
<222> (292)...(381)
25 <223> péptido de señal

```

<220>

<221> estructura_misclánea

<222> (382)...(2367)

<223> pro-proteína

5  <220>

    <221> péptido_maduro

    <222> (538)...(2367)

    <223> proteína madura

    <400> 48

10  cagcgacgtc gaggcgctca tggttgcagg cgggcgccgc cgttcagttc agggctctgag 60
    cctggaggag tgagccaggc agtgagactg gtcggggcgg gccgggacgc gtcggttcag 120
    cagcggctcc cagctcccag ccaggattcc gcgcgcccct tcacgcgccc tgctcctgaa 180
    cttcagctcc tgcacagtcc tccccaccgc aaggctcaag gcgcgcgcgg cgtggaccgc 240
    gcacggcctc taggtctcct cgccaggaca gcaacctctc ccctggccct catgggcacc 300

15  gtcagctcca ggcggtcctg gtggccgctg cactgctgc tgctgctgct gctgctcctg 360
    ggtcccgcgg gcgcccgtgc gcaggaggac gaggacggcg actacgagga gctgggtgcta 420
    gccttgcggt cagaggagga cggcctggcc gaagcaccgc agcacggaac cacagccacc 480
    ttccaccgct gcgccaagga tccgtggagg ttgcctggca cctacgtggt ggtgctgaag 540
    gaggagaccc acctctcgca gtcagagcgc actgcccgcc gcctgcaggc ccaggctgcc 600

20  cgccggggat acctcaccaa gatcctgcat gtcttccatg gccttcttcc tggcttctctg 660
    gtgaagatga gtggcgacct gctggagctg gccttgaagt tgcccatgt cgactacatc 720
    gaggaggact cctctgtctt tgcccagagc atcccgaggc acctggagcg gattaccctc 780
    ccacggtacc gggcggatga ataccagccc cccgacggag gcagcctggt ggaggtgtat 840
    ctctagaca ccagcataca gagtgaccac cgggaaatcg agggcagggg catggtcacc 900

25  gacttcgaga atgtgcccga ggaggacggg acccgcttcc acagacaggc cagcaagtgt 960

```


gacagtcacg gcacccacct ggcaggggtg gtcagcggcc gggatgccgg cgtggccaag 1020
 ggtgccagca tgcgcagcct gcgcgtgctc aactgccaaag ggaagggcac ggtagcggc 1080
 accctcatag gcctggagtt tattcggaaa agccagctgg tccagcctgt gggggcactg 1140
 gtgggtgctgc tgccctggc ggggtgggtac agccgcgtcc tcaacgccgc ctgccagcgc 1200
 5 ctggcgaggg ctggggctgt gctggtcacc gctgccggca acttccggga cgatgcctgc 1260
 ctctactccc cagcctcagc tcccgaggtc atcacagttg gggccaccaa tgcccaagac 1320
 cagccggtga ccctggggac tttggggacc aactttggcc gctgtgtgga cctctttgcc 1380
 ccaggggagg acatcattgg tgccctccagc gactgcagca cctgctttgt gtcacagagt 1440
 gggacatcac aggtgctgc ccacgtggct ggcattgcag ccatgatgct gtctgccgag 1500
 10 ccggagctca ccctggccga gttgaggcag agactgatcc acttctctgc caaagatgtc 1560
 atcaatgagg cctgggtccc tgaggaccag cgggtactga cccccaacct ggtggccgcc 1620
 ctgcccccca gcacccatgg ggcaggttgg cagctgtttt gcaggactgt atggtcagca 1680
 cactcggggc ctacacggat ggccacagcc gtcgcccgt gcgcccaga tgaggagctg 1740
 ctgagctgct ccagtttctc caggagtggg aagcggcggg gcgagcgcag ggaggcccaa 1800
 15 gggggcaagc tgggtctgcc ggcccacaac gcttttgggg gtgaggggtgt ctacgccatt 1860
 gccaggtgct gcctgctacc ccaggccaac tgcagcgtcc acacagctcc accagctgag 1920
 gccagcatgg ggaccctgt ccaactgccac caacagggcc acgtcctcac aggtgcagc 1980
 tcccactggg aggtggagga ccttggcacc cacaagccgc ctgtgctgag gccacgaggt 2040
 cagcccaacc agtgctggg ccacagggag gccagcatcc acgcttctg ctgccatgcc 2100
 20 ccaggtctgg aatgcaaagt caaggagcat ggaatcccgg ccctcagga gcaggtgacc 2160
 gtggcctgcg aggagggctg gaccctgact ggctgcagtg ccctccctgg gacctccac 2220
 gtctggggg cctacgccgt agacaacacg tgtgtagtca ggagccggga cgtcagcact 2280
 acaggcagca ccagcgaagg ggccgtgaca gccgttgcca tctgctgccg gagccggcac 2340
 ctggcgcagg cctcccagga gctccagtga cagcccatc ccaggatggg tgtctgggga 2400
 25 gggtaaggg ctggggctga gctttaaaat ggttccgact tgtccctctc tcagccctcc 2460

atggcctggc acgaggggat ggggatgctt ccgcctttcc ggggctgctg gcctggccct 2520
 tgagtggggc agcctccttg cctggaactc actcactctg ggtgcctcct cccaggtgg 2580
 aggtgccagg aagctccctc cctcactgtg gggcatttca ccattcaaac aggtcgagct 2640
 gtgctcgggt gctgccagct gctcccaatg tgccgatgtc cgtgggcaga atgactttta 2700
 5 ttgagctctt gttccgtgcc aggcattcaa tcctcaggtc tccaccaagg aggcaggatt 2760
 cttcccatgg ataggggagg gggcggtagg ggctgcaggg acaaacatcg ttgggggggtg 2820
 agtgtgaaag gtgctgatgg ccctcatctc cagctaactg tggagaagcc cctgggggct 2880
 ccctgattaa tggaggctta gctttctgga tggcatctag ccagaggctg gagacaggtg 2940
 cgcccctggt ggtcacaggc tgtgccttgg tttcctgagc cacctttact ctgctctatg 3000
 10 ccaggctgtg ctagcaacac ccaaagggtg cctgcgggga gccatcacct aggactgact 3060
 cggcagtgtg cagtgggtgca tgcactgtct cagccaaccc gctccactac ccggcagggt 3120
 acacattcgc acccctactt cacagaggaa gaaacctgga accagagggg gcgtgcctgc 3180
 caagctcaca cagcaggaac tgagccagaa acgcagattg ggctggctct gaagccaagc 3240
 ctcttcttac ttcacccggc tgggctcctc atttttacgg gtaacagtga ggctgggaag 3300
 15 gggaacacag accaggaagc tcggtgagtg atggcagaac gatgcctgca ggcatggaac 3360
 tttttccgtt atcaccagc cctgattcac tggcctggcg gagatgcttc taaggcatgg 3420
 tcgggggaga gggccaacaa ctgtccctcc ttgagcacca gccccacca agcaagcaga 3480
 cttttatctt ttgggtctgt cctctctgtt gcctttttac agccaacttt tctagacctg 3540
 ttttgctttt gtaacttgaa gatatttatt ctgggttttg tagcattttt attaatatgg 3600
 20 tgacttttta aaataaaaac aaacaaacgt tgtcct 3636
 <210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>

<223> epítopo sintético anti-PCSK9 en término C, residuos
680-692

<400> 49

Arg Ser Arg His Leu Ala Gln Ala Ser Gln Glu Leu Gln

5 1 5 10

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 $\langle 220 \rangle$

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

<400> 50

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

15 1 5 10

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 $\langle 220 \rangle$

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

<400> 51

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

25 1 5 10 15

	<210>	52	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia Artificial	
5	<220>		
	<223>	secuencia parcial sintética de la línea germinal humana Jk2 en segmento J de cadena ligera anti-PCSK9	
	<400>	52	
		Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
10	1	5	10
	<210>	53	
	<211>	12	
	<212>	PRT	
	<213>	Secuencia Artificial	
15	<220>		
	<223>	segmento J de longitud completa sintético a partir de la línea germinal humana Jk2	
	<400>	53	
		Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
20	1	5	10
	<210>	54	
	<211>	354	
	<212>	ADN	
	<213>	Mus musculus	
25	<220>		

<223> anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCSK9 LFU270

región variable de cadena pesada

<400> 54

gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagag cttatgaagc caggggcctc agtcaagttg 60

5 tctctgcacag cttctggctt caacatcaaa gacatgtata tgagctgggt gaggcagagg 120

cctgaacagg gcttggagtg gattggaagg atcgatcctg cgaatggtca tactaactat 180

gacccgaagt tccaggccaa ggccactata acaacagaca catcctccaa aacagcctac 240

ctgcatctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagaagttac 300

tattactatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ttca 354

10 <210> 55

<211> 318

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

15 <223> anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCSK9 LFU270

región variable de cadena ligera

<400> 55

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccagga 120

20 tcttccccca gactctggat ttatttaaca ttcaacttgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctctcaa tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg tctacagtgg agtagtgacc caccacgtt cggctcgggg 300

acaaagttgg aaataaaa 318

<210> 56

25 <211> 5

- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> mutante de PCSK9 sintético C-terminal A685X
- 5** <400> 56
- Arg Ser Arg His Leu
- 1 5
- <210> 57
- <211> 6
- 10** <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> marca his6, marca 6-His, marca HIS C-terminales sintéticas
- <400> 57
- 15** His His His His His His
- 1 5
- <210> 58
- <211> 19
- <212> ADN
- 20** <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador de amplificación de RT-PCR sintético V-H14 para
región variable de cadena pesada
- <400> 58
- 25** cttcctgatg gcagtggtt

	<210> 59	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador de amplificación de RT-PCR sintético HCconstante para región variable de cadena pesada	
	<400> 59	
	gcgtctagaa yctccacaca caggrccag tggatagac	39
10	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador de amplificación de RT-PCR sintético Vkappa4/5 para región variable de cadena ligera	
	<400> 60	
	tcagcttcyt gctaatcagt g	21
	<210> 61	
20	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de amplificación de RT-PCR sintético LCconstante	
25	para región variable de cadena ligera	

<400> 61

gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg 29

<210> 62

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> enlazador flexible C-terminal sintético y marca 6-His

<400> 62

10 Ala Ala Gly Ala Ser His His His His His His

1 5 10

<210> 63

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> marca Avi sintética para biotinilación dirigida al sitio

<400> 63

Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His

20 1 5 10 15

Glu

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CDRH1 sintética de SR066 (humaneered (humano-diseñado))
 <400> 64
 Thr Tyr Tyr Met Asn
 5 1 5
 <210> 65
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> CDRH1 sintética de SR038 (ratón)
 <400> 65
 Asp Met Tyr Met Ser
 1 5
 15 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> CDRH1 sintética de SR079 (humaneered (humano-diseñado))
 <400> 66
 Thr Met Tyr Met Ser
 1 5
 <210> 67
 25 <211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cadena ligera sintética 7472 (LC) - término N
5 <400> 67
 Glu Ile Val Met
 1
 <210> 68
 <211> 12
10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cadena ligera sintética 7472 (LC) - CDR1
 <400> 68
15 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser His Val Ala
 1 5 10
 <210> 69
 <211> 4
 <212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> LFU720 y pJG10 sintéticos - cadena ligera (LC) - término N
 <400> 69
 Gln Ile Val Leu
25 1

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> cadena ligera (LC) sintética LFU720 - región determinante de
 complementariedad 1 (CDR1)
 <400> 70
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 10 1 5 10
 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> cadena ligera (LC) sintética pJG10 - región determinante de
 complementariedad 1 (CDR1)
 <400> 71
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met His
 20 1 5 10
 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>

<223> 7472 y LFU720 sintéticos - cadena pesada CDR3 (CDRH3)

<400> 72

Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

5 <210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> pJG04 sintético - cadena pesada CDR3 (CDRH3)

<400> 73

Cys Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 74

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> anti-PCSK9 sintético - cadena pesada CDR2

20 <400> 74

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Glu His Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 75

25 <211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> anti-PCSK9 sintético - cadena pesada CDR3
 5 <221> VARIANTE
 <222> (6)...(6)
 <223> Xaa = Ala o Asn
 <400> 75
 Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Met Asp Tyr
 10 1 5
 <210> 76
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> anti-PCSK9 sintético - cadena ligera FR1
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)...(4)
 20 <223> Xaa = Met o Leu
 <400> 76
 Glx Ile Val Xaa Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 25 20

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 53967 - WO - PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2010/059959	International filing date (<i>day/month/year</i>) 10/12/2010	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 11/12/2009
Applicant IRM LLC		

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 43.6**bis**(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/US2010/059959

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/US2010/059959

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The present disclosure provides antibody antagonists against proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a ("PCSK9") and methods of using such antibodies.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/059959

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/40 A61K39/395 A61P3/06
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 A61P

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, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NI YAN G ET AL: "A PCSK9 C-terminal Domain Binding Fab Inhibits PCSK9 Internalization and Restores LDL-uptake", CIRCULATION, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 120, no. 18, Suppl. 2, 1 November 2009 (2009-11-01), page S477, XP008121212, ISSN: 0009-7322	1-33
Y	the whole document	34-50
X	WO 2008/057459 A2 (MERCK & CO INC [US]; SPARROW CARL P [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT) 15 May 2008 (2008-05-15)	1-33
Y	page 3, lines 23-28; figures 3A, 3B; examples; table 3	34-50
	----- -/--	



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

28 January 2011

Date of mailing of the international search report

10/02/2011

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

Luyten, Kattie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/059959

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/026558 A1 (AMGEN INC [US]; JACKSON SIMON MARK [US]; WALKER NIGEL PELHAM CLINTON []) 26 February 2009 (2009-02-26) figures 8, 10-12, 14, 28D; examples 1-7, 9, 11-17, 19-21, 24-26; table 7.1 -----	1-50
Y	WO 2009/100297 A1 (MERCK & CO INC [US]; ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO [IT]; CONDRA JON H) 13 August 2009 (2009-08-13) figures 5, 15; examples 1-14 -----	1-50
Y	LI HAI ET AL: "Recent patents on PCSK9: a new target for treating hypercholesterolemia.", RECENT PATENTS ON DNA & GENE SEQUENCES NOV 2009 LNKD- PUBMED:19601924, vol. 3, no. 3, November 2009 (2009-11), pages 201-212, XP002619049, ISSN: 1872-2156 -----	34-50
A	whole document, especially page 205, paragraph 2 -----	1-33
X,P	NI YAN G ET AL: "A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 23 APR 2010 LNKD- PUBMED:20172854, vol. 285, no. 17, 23 April 2010 (2010-04-23), pages 12882-12891, XP002619048, ISSN: 1083-351X -----	1-33
Y,P	the whole document -----	34-50
X,P	WO 2010/068526 A1 (MERCK SHARP & DOHME [US]; NI YAN [US]; SITLANI AYESHA [US]; PANDIT SHI) 17 June 2010 (2010-06-17) page 4, lines 22-23; examples -----	1-33
A	DUFF CHRISTOPHER J ET AL: "Antibody-mediated disruption of the interaction between PCSK9 and the low-density lipoprotein receptor.", THE BIOCHEMICAL JOURNAL 1 MAY 2009 LNKD- PUBMED:19196236, vol. 419, no. 3, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 577-584, XP002619050, ISSN: 1470-8728 whole document, especially page 578, paragraph 2; Figures 2 and 4 -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/059959

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008057459	A2	15-05-2008	
		AU 2007322265 A1	29-05-2008
		CA 2667894 A1	15-05-2008
		CA 2669424 A1	29-05-2008
		EP 2083861 A2	05-08-2009
		EP 2083864 A2	05-08-2009
		JP 2010508817 T	25-03-2010
		US 2010136028 A1	03-06-2010
		US 2010041102 A1	18-02-2010
		WO 2008063382 A2	29-05-2008
WO 2009026558	A1	26-02-2009	
		AR 068011 A1	28-10-2009
		AU 2008288791 A1	26-02-2009
		CA 2696252 A1	26-02-2009
		CN 101932607 A	29-12-2010
		CO 6230997 A2	20-12-2010
		CR 11328 A	12-07-2010
		EA 201000356 A1	30-08-2010
		EP 2215124 A1	11-08-2010
		JP 2010536384 T	02-12-2010
		KR 20100057070 A	28-05-2010
		PE 10062009 A1	14-08-2009
		US 2009142352 A1	04-06-2009
		US 2009326202 A1	31-12-2009
WO 2009100297	A1	13-08-2009	
		AR 070316 A1	31-03-2010
		AU 2009212262 A1	13-08-2009
		CA 2711794 A1	13-08-2009
		EP 2245071 A1	03-11-2010
		PA 8815301 A1	17-09-2009
		US 2009246192 A1	01-10-2009
WO 2010068526	A1	17-06-2010	NONE